

Neuronale Verteilung des Enzyms Glutaminylzyklase  
im Kortex und der hippocampalen Formation  
des humanen Gehirns

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.  
an der Medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Moritz Kreuzberger

Geb. am 30.04.1987 in Offenbach am Main

angefertigt am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung,  
Abteilung Molekulare und Zelluläre Mechanismen der Neurodegeneration

Betreuer:

Prof. Dr. Thomas Arendt, PD Dr. Dr. Markus Morawski und Prof. Dr. Steffen Roßner

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 27.01.2015

„Nicht weil es schwer ist, wagen wir es nicht,  
sondern weil wir es nicht wagen,  
ist es schwer.“

- L. A. Seneca

## **Bibliographische Beschreibung:**

Kreuzberger, Moritz

### Neuronale Verteilung des Enzyms Glutaminylzyklase im Kortex und der hippocampalen Formation des humanen Gehirns

Universität Leipzig, Dissertation

69 Seiten, 124 Literaturangaben, 15 Abbildungen, 3 Tabellen

Referat:

Intra- und extrazelluläre Ablagerungen von  $\beta$ -Amyloid (Abeta) sind ein neuropathologisches Hauptmerkmal der Alzheimerschen Demenz (AD). Für N-terminal modifizierte Abeta-Peptide, die einen Pyroglutamyl-Laktamring (pE-Abeta) aufweisen, wird auf Grund ihrer biophysikalischen Eigenschaften eine entscheidende Rolle für die Pathogenese der AD angenommen. Diese Abeta-Spezies aggregieren schneller als unmodifiziertes Abeta, sind gegen Proteolyse geschützt und stark neurotoxisch. Das Enzym Glutaminylzyklase (QC) katalysiert die n-terminale pE-Modifikation von zahlreichen physiologischen Neuropeptiden, aber auch von Abeta zu pE-Abeta *in vivo*. Darüber hinaus wird QC in Neuronenpopulationen nachgewiesen, für die ein starker Verlust von Synapsen und Neuronen im Zusammenhang mit AD beschrieben wurde. Die vorliegende Arbeit beschreibt das Verteilungsmuster dieses Enzyms im temporalen Kortex und der hippocampalen Formation in den Gehirnen von Patienten mit der AD und kognitiv gesunden Kontrollen. Hierfür wurden verschiedene gegen QC und pE-Abeta gerichtete Antikörper verwendet. Zusätzlich wurde unter Anwendung immunhistochemischer und histologischer Färbetechniken der Anteil von Neuronen bestimmt, in denen QC detektiert werden konnte und auf Unterschiede in Bezug auf die Verteilung und Stärke der QC-Immunreaktivität in den Gehirnen von Alzheimerpatienten und Kontrollen untersucht. Hierdurch ließen sich Neuronenpopulationen identifizieren, die potentiell gefährdet sind, durch eine pE-Abeta-abhängige Neurodegeneration geschädigt zu werden. Diese Schädigung könnte direkt durch die lokale Expression von QC oder indirekt durch Afferenzen aus QC-reichen Gebieten vermittelt werden.

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Fallbeispiel	1
1.2. Epidemiologie der Alzheimerschen Erkrankung	1-2
1.3. Derzeitige Pharmakotherapie	2
1.4. Neuropathologie der Alzheimerschen Demenz	3
1.5. Amyloidprozessierung	3-5
1.6. Das Enzym Glutaminylzyklase	7-8
1.7. Fragestellung	8-9
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>10</b>
2.1. Humanes Hirngewebe von Alzheimer- und Kontrollfällen	10-11
2.2. Anfertigung von Gefrierschnitten	11
2.3. Kresylviolett-Färbung nach Nissl	12
2.4. Immunhistochemie	12-16
2.5. Vergleich von vier Anti-QC-Antikörpern	17-18
2.6. Zählmethodik	19-22
2.7. Verwendete Hard- und Software	20
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>23</b>
3.1. Neuronendichten der untersuchten Hirnregionen in Alzheimer- und Kontrollgehirnen	23-24
3.2. QC-Immunreaktivität in Alzheimer- und Kontrollgehirnen	25
3.2.1. QC-Immunreaktivität im temporalen Kortex	25-26
3.2.2. QC-Immunreaktivität im entorhinalen Kortex	27-28
3.2.3. QC-Immunreaktivität im Subikulum und Ammonshorn	29-31
3.3. Stärke der QC-Immunreaktivität in Alzheimer- und Kontrollgehirnen	32
3.3.1. Stärke der QC-Immunreaktivität im temporalen Kortex	32-33
3.3.2. Stärke der QC-Immunreaktivität im entorhinalen Kortex	34-35
3.4. Schichtspezifische Verteilung der QC-Immunreaktivität im temporalen und entorhinalen Kortex in Alzheimer- und Kontrollgehirnen	36-38
3.5. QC-Immunreaktivität der Ammonshornregionen CA1 – CA4	39-40
<b>4. Diskussion</b>	<b>41</b>
4.1. Abeta-Spezies und QC in der AD	41-42
4.2. QC im temporalen Kortex	42-44
4.3. QC im entorhinalen Kortex	44-47
4.4. QC im Hippocampus	47-49
4.5. Regionale, schichtspezifische und neuronale Verteilung von QC	49-51
4.6. Ausblick	51-53
<b>5. Zusammenfassung (Deutsch und Englisch)</b>	<b>54-55</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>56-65</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>66</b>
7.1. Färbeprotokoll für Immunhistochemie	66
7.2. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	67
7.3. Lebenslauf	68
7.4. Danksagung	69

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abeta	$\beta$ -Amyloid
AD	Alzheimersche Demenz
ADAM	„A Disintegrin And Metalloproteinase“
AICD	„APP Intracellular Domain“
APP	„Amyloid Precursor Protein“, Amyloidvorläufer-Protein
APH	„Anterior Pharynx-Defective“
BACE	„ $\beta$ -site APP Cleaving Enzyme“, Beta-Sekretase
CA	Cornu Ammonis
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
FPP	„Fertilization Promoting Peptide“
KO	Kontrollen
MCP	„Monocyte Chemotactic Protein“
NbM	Nucleus basalis Meynert
nLC	Nucleus locus ceruleus
Ni	Nickelammoniumsulfat-6-hydrat
PBS(-T)	Phosphatgepufferte Salzlösung (mit Zusatz von Tween)
pE-Abeta	pyroGlutamat modifiziertes $\beta$ -Amyloid
QC	Glutaminylzyklase
SD	Standardabweichung
TRH	„Thyrotropin Releasing-Hormone“, Thyreoliberin
TRIS-Puffer	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-gepufferte Salzlösung

# 1. Einleitung

## 1.1. Fallbeispiel

*Erika Schuster ist 84 Jahre alt und lebt im Haus ihrer Eltern seitdem sie denken kann. Als vor 7 Jahren Ärzte die Verdachtsdiagnose Alzheimersche Demenz bei ihr stellten, war für ihre Tochter Anne klar, dass sie und ihr Ehemann zu ihrer Mutter ziehen würden, um diese zu unterstützen. Die Betreuung ihrer alleinstehenden Mutter konnte Anne in den ersten Jahren noch bewältigen, doch die starke Progredienz, mit der diese Erkrankung die betroffenen Patienten ihrer Fähigkeiten beraubt, machte bald die Unterstützung durch einen ambulanten Pflegedienst notwendig. Wo anfänglich Konzentrationsschwierigkeiten, sprachliche Ungereimtheiten und das Vergessen von Terminen im Vordergrund standen, war Erika bald in immer mehr und schließlich in nahezu allen Bereichen des täglichen Lebens auf Hilfe angewiesen. Heute spricht Erika nur noch ein paar Worte, die oft aus dem Zusammenhang gerissen wirken. Sie scheint vergessen zu haben, wer sie ist, was der Grund dafür ist, dass sie ihr Bett kaum noch verlassen kann und dass Anne keine Pflegerin, sondern ihre Tochter ist.*

*In letzter Zeit hat Erika trotz guter Pflege immer wieder mit schweren Lungenentzündungen zu kämpfen, was ihrem Hausarzt Sorgen bereitet. Er weiß, dass die Medikamente, die ihm derzeit zur Behandlung ihrer dementiellen Erkrankung zur Verfügung stehen, keine Möglichkeiten bieten, das Fortschreiten dieser Krankheit zu stoppen oder gar umzukehren.*

## 1.2. Epidemiologie der Alzheimerschen Erkrankung

Das Schicksal von Erika Schuster steht beispielhaft für das Erleben von derzeit circa 1,3 Millionen Menschen mit einer Altersdemenz und ihrer Angehörigen in Deutschland. Auch wenn die Diagnose einer Demenz mit Hilfe von neuropsychologischen Tests, Biomarkern und bildgebenden Verfahren gestellt wird, kann letztlich nur die histopathologische Untersuchung des Gehirns zeigen, ob es sich in ihrem Falle tatsächlich um eine Demenz vom Alzheimerstyp handelt. Diese Untersuchung gilt heute wie früher als einzige Methode, die eine definitive Diagnosesicherung zulässt. Obgleich sich die einzelnen Demenzformen stark miteinander vermischen können (Esiri, 2001) stellt die Alzheimersche Demenz (AD) mit circa zwei Dritteln aus der Gruppe dieser neurodegenerativen Erkrankungen die am häufigsten diagnostizierte Demenzform

dar (Sütterlin *et al.*, 2011). Mit fortschreitendem Alter steigt die Wahrscheinlichkeit die Folgen einer über Jahrzehntelang fortschreitenden Neurodegeneration im Rahmen der AD typischen Symptomatik zu erleben, dramatisch an (Braak *et al.*, 1999; Turner 2006). Es ist davon auszugehen, dass demenzielle Erkrankungen wie die AD mit einer weiter steigenden Lebenserwartung stark zunehmen werden (Steel, 1997; Sütterlin *et al.*, 2011). Prognosen für das Jahr 2050 gehen davon aus, dass mehr als 30% der deutschen Bevölkerung älter als 65 Jahre sein und sich die Zahl der Demenzzkranken mehr als verdoppeln wird (Eisenmenger *et al.*, 2006; Sütterlin *et al.*, 2011).

Vor diesem Hintergrund wird klar, dass Politik und Gesellschaft sich in Zukunft noch intensiver mit dem Thema demenzieller Erkrankungen auseinandersetzen müssen und auf die Unterstützung von Wissenschaft und Forschung angewiesen sind. Neue bildgebende Verfahren und Biomarker, sowie pharmakologische Ansätze dürften hierbei eine Schlüsselrolle spielen.

### 1.3. Derzeitige Pharmakotherapie

Zum heutigen Zeitpunkt sind die medikamentösen Therapieoptionen der AD für betroffene Patienten und behandelnde Ärzte unbefriedigend. In Deutschland stehen für die Pharmakotherapie hauptsächlich die drei Acetylcholinesterasehemmer Donepezil, Rivastigmin, Galantamin und der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantine zur Verfügung (Roberson und Mucke, 2006; Castellani *et al.*, 2010).

Aus heutiger Sicht zeigen diese Pharmakotherapeutika neben teilweise nur geringen Effekten auf die demenzielle Symptomatik, bei bestehenden Kontraindikationen und Nebenwirkungen nur eine geringe oder keine krankheitsmodulierende Wirksamkeit und greifen damit zu kurz (Delrieu *et al.*, 2011). Das Ziel müssen pharmakologische Konzepte sein, die in pathologische Mechanismen eingreifen, bevor es zu einer massiven Neurodegeneration und ausgeprägten Symptomen gekommen ist (Galimberti und Scarpini, 2011).

## 1.4. Neuropathologie der Alzheimerischen Demenz

In den Gehirnen von Patienten mit AD finden sich eine Reihe pathologischer Veränderungen, darunter Gefäßveränderungen, Gliose, mitochondriale Dysfunktionen, Entzündungen und Veränderungen in der Zellzyklusregulierung (Esiri *et al.*, 2001, zur Übersicht siehe Castellani *et al.*, 2010). Es kommt zu Zell- und Synapsenverlust mit starker Betonung der frontalen und temporalen Assoziationskortex, die sich makroskopisch als Atrophie darstellt (Turner 2006; Blennow *et al.*, 2006; Arendt, 2009). Die für die AD als charakteristisch angesehenen Hauptmerkmale sind jedoch intrazellulär aggregiertes Tau-Protein sowie intra- und extrazellulär aggregiertes  $\beta$ -Amyloid (Abeta) (Goedert *et al.*, 2006; Roberson und Mucke, 2006; Castellani *et al.*, 2010). Dabei scheinen gerade diese Merkmale hinsichtlich ihrer pathophysiologischen Entstehung und ihres neuronalen Verteilungsmusters zu differieren (Braak und Braak, 1991; Braak *et al.*, 1999). Auch wenn die Ätiologie dieser Krankheit weiterhin unbekannt ist, häufen sich die Hinweise, dass der Entstehung von verschiedenen Abeta-Spezies eine zentrale Rolle in der frühen Krankheitsentstehung zukommt (Hardy und Higgins, 2002; Walsh und Selkoe, 2007; Gunn *et al.*, 2010).

## 1.5. Amyloidprozessierung

Abeta-Peptide entstehen durch Prozessierung des Amyloidvorläufer-Proteins (engl. Amyloid-Precursor-Protein, APP). Über die physiologische Funktion dieses transmembranären Glykoproteins (Typ I Membranprotein) ist wenig bekannt, jedoch weiß man, dass es in großen Mengen von Zellen des zentralen Nervensystems produziert wird und für das Überleben und Wachstum sowie für die funktionelle Integrität von Nervenzellen unerlässlich ist (Kang *et al.*, 1987; Dyrks *et al.*, 1988; Rossner *et al.*, 1998; Arendt, 2009; Lichtenthaler *et al.*, 2011). Neuere Arbeiten zeigen zudem eine mögliche, zentrale Funktion für die Eisen- und Kupferhomöostase des zentralen Nervensystems auf (Duce und Bush, 2010; Lei *et al.*, 2012).

Die 4 bislang bekannten APP-Splicevarianten haben eine Länge von 695 bis 770 Aminosäuren und werden auf Chromosom 21 codiert (Golde *et al.*, 1990). Der Großteil des membranständigen APP's wird internalisiert und lysosomal abgebaut oder durch eine Alpha-Sekretase gespalten (zur Übersicht siehe Rossner *et al.*, 1998). Nachdem in der Vergangenheit einige Metalloproteinasen aus der ADAM Familie als mögliche



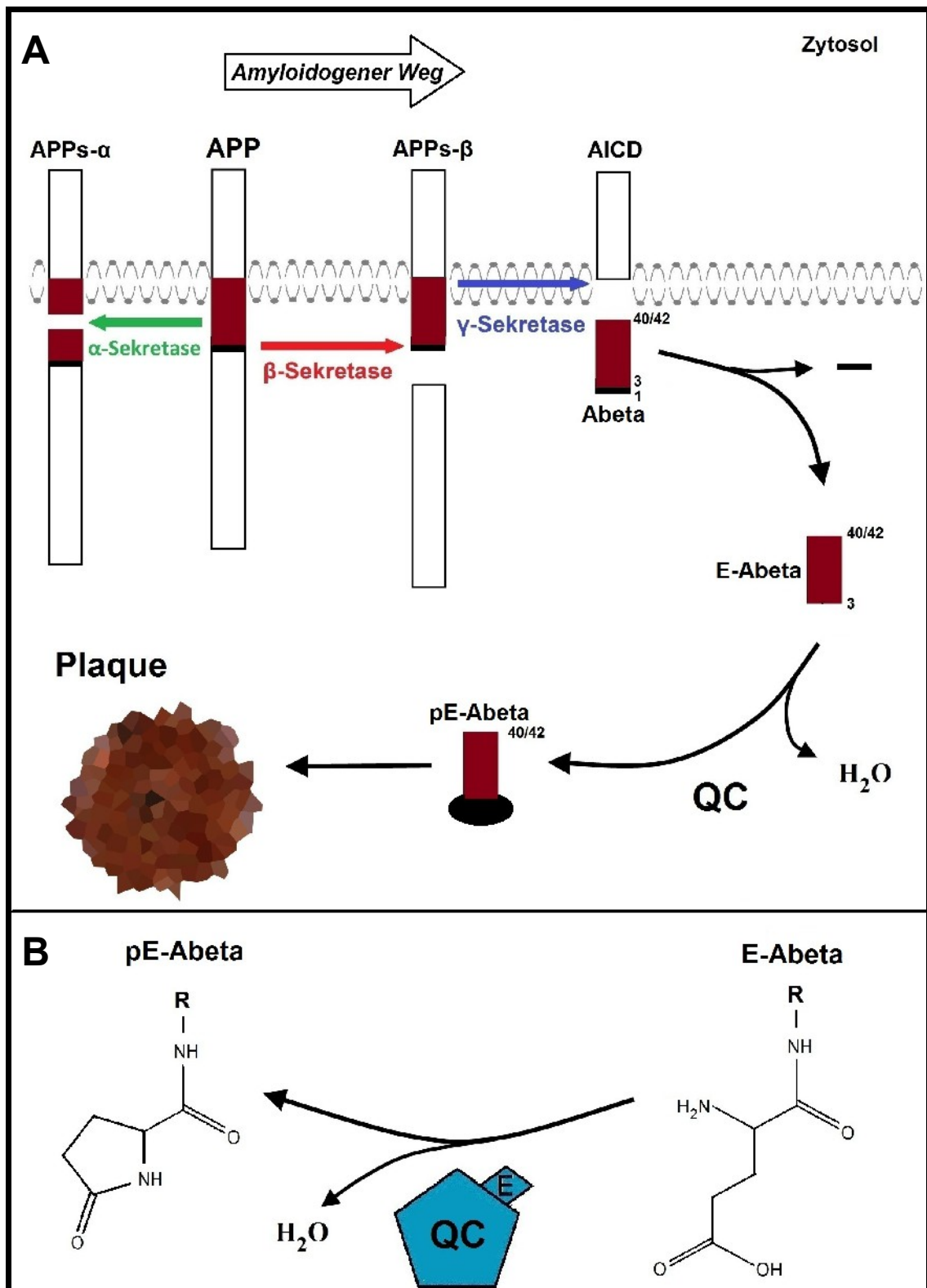
Alpha-Sekretase in Neuronen diskutiert wurden, geht man heute davon aus, dass das Enzym ADAM-10 die einzige Alpha-Sekretase im konstitutiven APP-Prozessierungsweg *in vivo* ist (Lammich *et al.*, 1999; Allinson *et al.*, 2003; Lichtenthaler, 2011). Bei der Abeta-Entstehung wird APP durch eine Beta- und eine Gamma-Sekretase gespalten (Amyloidogener Weg, Abb. 1A). Als mögliche Beta-Sekretasen wurden Cathepsin D und BACE-1 identifiziert (Haass, 2004; Hook *et al.*, 2008). Die Gamma-Sekretase hingegen besteht aus einem Multienzymkomplex, dessen katalytische Funktion von den Bestandteilen Nicastrin, Präsenilin 1, Präsenilin 2 und APH-1 abhängt und APP innerhalb der Transmembrandomäne spaltet (Selkoe, 1996; Haass, 2004). Abeta-Peptide werden über einen regulierten und einen konstitutiven Weg sezerniert, wobei letzterem nur eine untergeordnete Rolle zukommt (Tezapsidis *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Beta- und Gamma-Sekretase APP auch in sekretorischen Vesikeln spalten (Tezapsidis *et al.*, 1998; Haass, 2004). Abhängig von der Schnittstelle der Gamma-Sekretase entstehen Abeta-Peptide mit einer Gesamtlänge von bis zu 43 Aminosäuren (Abeta(1-43)) (Kang *et al.*, 1987; Iwatsubo *et al.*, 1994).

In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, dass Abeta-Peptide eine heterogene Gruppe mit N- und C-terminalen Modifikationen darstellen. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Abeta-Spezies hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften teilweise erheblich. C-terminal endet der überwiegende Anteil der gebildeten Abeta-Peptide mit der Aminosäure Valin an Stelle 40 (Abeta(x-40)). Abeta(x-42) Peptide machen weniger als 10% des gebildeten Abeta aus (Näslund, 2000), aggregieren jedoch schneller als Abeta(x-40) (Walsh und Selkoe, 2007) und stellen den Hauptbestandteil der senilen Plaques dar (McGowan *et al.*, 2005; Portelius *et al.*, 2010), während Abeta(1-40) Peptide auch neuroprotektive Eigenschaften zeigen (Kim *et al.*, 2007).

Am N-Terminus des Abeta-Moleküls sind eine Vielzahl an Modifikationen bekannt, die beispielsweise durch Racemisierung, Isomerisierung, Nitrierung, Phosphorylierung oder Verkürzung um einige Aminosäuren entstehen (Saido *et al.*, 1995; Saido *et al.*, 1996; Miravalle *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2011; Kummer *et al.*, 2011). In der jüngsten Vergangenheit fanden jedoch vor allem Abeta-Spezies Beachtung, die einen endständigen Pyroglutamyl-Laktamring (pyroGlu oder pE) aufweisen (He und Barrow, 1999; Russo *et al.*, 2002; D'Arrigo *et al.*, 2009; Schlenzig *et al.*, 2009). pE-Abeta(3-40/42) und pE-Abeta(11-40/42) Peptide entstehen durch Zyklisierung aus Abeta-Peptiden, die N-terminal um 2 oder 10 Aminosäuren verkürzt wurden (Saido *et al.*,

1995; He und Barrow, 1999; D'Arrigo *et al.*, 2009). Diese machen einen Hauptbestandteil der Abeta-Ablagerungen in den Gehirnen von Alzheimerpatienten aus, nicht aber in den Gehirnen von kognitiv Gesunden (Saido *et al.*, 1995; Harigaya *et al.*, 2000; Piccini *et al.*, 2005; Vanderstichele *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Schilling *et al.*, 2008a; Wirths *et al.*, 2010b). Dabei konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob diese N-terminalen Verkürzungen durch bislang unbekannte Aminopeptidasen oder durch alternatives Schneiden der Beta-Sekretase verursacht werden. Einige Autoren gehen davon aus, dass letztlich sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Prozesse für die N-terminale Verkürzung von Abeta verantwortlich sind (Gunn *et al.*, 2010). Interessanterweise treten pE-modifizierte Abeta-Spezies besonders in den frühen Stadien dieser Erkrankung auf und machen dann den größten Teil der Gesamt-Abeta-Last aus (Sergeant *et al.*, 2003; Piccini *et al.*, 2005). Diese pE-Abeta-Peptide sind gegenüber enzymatischer Proteolyse durch die meisten Aminopeptidasen resistent (Saido *et al.*, 1995; Saido *et al.*, 1996; Schilling, 2004). Sie sind hydrophober und aggregieren schneller als Abeta (1-40/42), sind stark neurotoxisch (He und Barrow, 1999; Russo *et al.*, 2002; Wirths *et al.*, 2009) und wirken als Aggregationskeim für andere Abeta-Spezies (Saido *et al.*, 1995; Pike *et al.*, 1995; Schilling *et al.*, 2006; D'Arrigo *et al.*, 2009; Schlenzig *et al.*, 2009). Zugleich wurde diesen Peptiden eine direkte Neurotoxizität in Zellkultur-Experimenten und in transgenen Tieren nachgewiesen (Pike *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 2002; Piccini *et al.*, 2005; Wirths *et al.*, 2009). Dabei scheint diese Neurotoxizität vorwiegend von intrazellulär gebildeten pE-Abeta-Oligomeren auszugehen und wird nicht wie in der Vergangenheit angenommen durch größere Plaqueablagerungen vermittelt zu sein (Takahashi *et al.*, 2004; Lambert *et al.*, 2007; Walsh und Selkoe, 2007; Koffie *et al.*, 2009).

Sowohl *in vivo* in Tiermodellen als auch *in vitro* in Zellkulturmodellen wurde gezeigt, dass unter physiologischen Bedingungen das Enzym Glutaminylzyklase (QC) die Zyklisierung von Glutamyl-Abeta zu pE-Abeta katalysiert (Schilling *et al.*, 2004; Schilling *et al.*, 2008a; Cynis *et al.*, 2008). Die spontane Zyklisierung von Glutamylresten findet unter physiologischen Bedingungen sehr langsam statt und gilt im Hinblick auf die Gesamt-Abeta-Menge als vernachlässigbar (Busby *et al.*, 1987; Schilling *et al.*, 2004; Cynis *et al.*, 2006). Die Entstehung von Abeta-Peptiden auf dem amyloidogenen Weg sowie die durch QC katalysierte Zyklisierung von N-terminal verkürzten Abeta-Peptiden sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Zusammenspiels von Glutaminylzyklase (QC) und Abeta-Spezies (**Abeta**) aus dem amyloidogenen Weg. Nach Spaltung des Amyloidvorläufer-Proteins (**APP**) durch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretasen entstehen Abeta-Peptide die nach n-terminaler Verkürzung durch **QC** zu **pE-Abeta** zyklisiert werden können und AD spezifische Plaques bilden (A). Bei der durch QC katalysierten Reaktion werden N-terminale Glutamatreste unter Wasserabspaltung zyklisiert (B).

## 1.6. Das Enzym Glutaminylzyklase

Das Enzym Glutaminylzyklase (QC, EC 2.3.2.5) wurde erstmals von Messer und Ottesen aus der Papayafrucht (*Carica papaya*) isoliert und beschrieben (Messer und Ottesen 1965). Seither wurden QCs in Bakterien und verschiedensten Spezies gefunden, darunter Schlangen, Hühner und höhere Säugetiere wie Ratten, Schafe, Rinder sowie im Menschen (Fischer und Spiess, 1987; Busby *et al.*, 1987; Böckers *et al.*, 1995; Dahl *et al.*, 2000). Dabei unterscheiden sich die jeweiligen Enzyme zum Teil deutlich hinsichtlich ihres strukturellen Aufbaus, der Resistenz gegenüber Denaturierung und Inhibitoren sowie ihrer pH-Optima (Dahl *et al.*, 2000) und erfüllen in Pflanzen und Säugetieren vermutlich unterschiedliche Funktionen (Schilling, 2004). Die humane QC ist ein monomeres Metalloenzym (Acyltransferase) mit Zink im aktiven Zentrum und katalysiert die Zyklisierung von N-terminalen Glutamin- und Glutamatresten (Pohl *et al.*, 1991; Schilling *et al.*, 2004). Eine Reihe von Peptidhormonen und Chemokinen wie Orexin A, Gastrin, Gonadotropin, TRH, MCP-1 bis 4, FPP, Fibronektin und Neurotensin sind Substrate der QC und erfüllen ihre physiologische Funktion stark abhängig von einem N-terminalen pE-Rest (Fischer und Spiess, 1987; Busby *et al.*, 1987; Pohl *et al.*, 1991; Böckers *et al.*, 1995; Schilling, 2004; Cynis, 2009). Zwischen 2004 und 2008 wurde durch *in vivo* Studien gezeigt, dass auch N-terminale Glutamylreste von Abeta-Peptiden maßgeblich durch die QC zyklisiert werden (Schilling *et al.*, 2004, Schilling *et al.*, 2008a; Schilling *et al.*, 2008b). QC wird stark in Gebieten des zentralen Nervensystems wie der Hypophyse, dem Hypothalamus, dem Hippocampus, dem Striatum und exokrinen Drüsen wie der Schilddrüse und dem Thymus exprimiert und über die gleichen Wege transportiert wie ihre Substrate (Busby *et al.*, 1987; Fischer und Spiess, 1987; Pohl *et al.*, 1991). Es konnte gezeigt werden, dass homozygote QC Knock-out Mäuse nur gering erniedrigte Hormonspiegel aufweisen, darüber hinaus aber weitestgehend unauffällig sind (Schilling *et al.*, 2011). Diese Erkenntnisse sprechen für eine zell- und gewebespezifische Expression der QC (Schilling, 2004), die intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-System und in sekretorischen Vesikeln lokalisiert ist (Fischer und Spiess, 1987; Böckers *et al.*, 1995; Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2009; Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2011). Glutamylreste werden durch die QC optimal in einem leicht sauren Milieu (pH=6) umgesetzt, wenn der N-Terminus insgesamt ungeladen vorliegt (Schilling, 2004; Schilling *et al.*, 2004). Die Lokalisation dieses Enzyms und seiner Substrate in intrazellulären Kompartimenten und das hier

vorherrschende leicht saure Milieu deuten darauf hin, dass pE-Abeta-Spezies *in vivo* vorwiegend intrazellulär gebildet werden, wie es im Zellkulturmodell bereits gezeigt wurde (Cynis *et al.*, 2008).

Ihre zentrale Rolle bei der Entstehung von neurotoxischen Abeta-Spezies machen die QC zu einem möglichen Ziel für die Entwicklung von Pharmaka, die einen kausalen Therapieansatz für die Alzheimersche Erkrankung und andere Amyloidosen verfolgen (Schilling, 2004; Cynis *et al.*, 2006; Galimberti und Scarpini, 2011). Erste Studien an Tiermodellen konnten zeigen, dass QC-Inhibitoren die Gesamt-Abeta-Last und Gliose in den untersuchten Gehirnregionen verringern und Gedächtnisleistungen verbessern (Schilling *et al.*, 2008a; Schilling *et al.*, 2008b).

## 1.7. Fragestellung

Es ist bekannt, dass die frühe Degeneration von subkortikalen Kerngebieten wie dem Nucleus Locus Ceruleus (nLC) und Nucleus basalis Meynert (NbM) zu einem gravierenden Verlust für die noradrenerge und cholinerge Versorgung der Großhirnrinde führt und mit der Schwere der AD korreliert (Whitehouse *et al.*, 1981; Coyle *et al.*, 1983; Arendt *et al.*, 1983; Bondareff *et al.*, 1987; German *et al.*, 1992; Busch *et al.*, 1997; Heneka *et al.*, 2006; Weinshenker, 2008). Nachdem für diese Kerngebiete eine starke QC-Expression gezeigt wurde (Morawski *et al.*, 2010), könnte im Zusammenhang mit dem frühen Zeitpunkt ihrer Schädigungen eine gesteigerte QC-Aktivität als ein Risikofaktor für eine Zellschädigung angesehen werden. An einer kleineren Fallzahl von Gehirnen konnte mittels quantitativer PCR und Western Blot Untersuchungen zudem gezeigt werden, dass QC in den temporalen Kortex von Alzheimerpatienten stärker exprimiert wird, als dies in Gehirnen von Kontrollen der Fall war (Schilling *et al.*, 2008a). Die zentrale Rolle dieses Enzyms für die Bildung von pE-Abeta-Peptiden machen die QC zu einem aussichtsreichen Ansatzpunkt für die Entwicklung von pharmakologischen Konzepten zur Bekämpfung dieser schwerwiegenden Erkrankung. Darüber hinaus kann die Erforschung dieses Enzyms und seiner Charakteristika dazu beitragen, unser Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen der AD zu verbessern.

Für meine Arbeit ergaben sich hieraus folgende Fragestellungen:

1. Es war zu prüfen, ob sich Gehirne von Patienten mit fortgeschrittener AD und Kontrollgehirne hinsichtlich des Anteils und der Verteilung QC-positiver Neurone sowie der Intensität ihrer Färbung in diesen Hirnregionen unterscheiden.
2. Darüber hinaus war zu prüfen, ob QC in Hirnregionen gefunden werden kann, die als erste von AD-typischen Pathologien betroffen sind oder mit diesen in Verbindung stehen.

Dies sollte für den temporalen Kortex, den Hippocampus sowie den angrenzenden entorhinalen Kortex an humanem *post mortem* Gewebe untersucht werden. Hierdurch ließen sich Neuronenpopulationen identifizieren, die potentiell gefährdet sind, durch eine pE-Abeta-abhängige Neurodegeneration geschädigt zu werden. Diese Schädigung könnte direkt durch die lokale Expression von QC oder indirekt durch Afferenzen aus QC-reichen Gebieten vermittelt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Humanes Hirngewebe von Alzheimer- und Kontrollfällen

Für die Untersuchungen wurde ausschließlich humanes *post mortem* Hirngewebe aus insgesamt 24 Gehirnen verwendet, welche von der Hirnbank der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt wurden. Es handelt sich dabei um 12 Gehirne von Individuen, bei denen weder klinisch noch durch eine ausführliche neuropathologische Untersuchung Anzeichen einer neurodegenerativen Veränderung im Sinne eines Morbus Alzheimer oder einer anderen neurologischen Erkrankung festgestellt wurde (Kontrollgehirne) und 12 Gehirne von Individuen bei denen klinisch starke Hinweise auf das Vorliegen einer Demenz vom Alzheimer-Typ bestanden bzw. eine solche Diagnose gestellt wurde (Gehirne mit AD-Pathologie). Für letztere wurde entsprechend der von Braak und Braak beschriebenen Methodik eine Stadieneinteilung durchgeführt (Braak und Braak, 1991). Diese Stadieneinteilung richtet sich vor allen Dingen nach der Anzahl Thioflavin positiver Plaques pro Fläche sowie der Anzahl intrazellulärer Einschlüsse (Neurofibrillenbündeln und Neuropilfäden) pro Fläche, von denen man weiß, dass sie mit dem kognitiven Status von Patienten zum Zeitpunkt des Todes korrelieren (Goedert *et al.*, 2006). Auf diese Veränderungen werden 3 Hirnregionen untersucht: die (trans-) entorhinale Region, der Hippocampus und der okzipitale Kortex. Entsprechend werden die für die Alzheimersche Erkrankung typischen, neuropathologischen Veränderungen in drei Stadien gegliedert: 1. das entorhinale Stadium (I+II), 2. das limbische Stadium (III+IV) und 3. das isokortikale Stadium (V+VI) ( Braak und Braak, 1991).

Mit Ausnahme eines Gehirns wurden alle untersuchten Gehirne aus der Alzheimergruppe dem letzten, isokortikalen Stadium zugeordnet (V+VI). Ein Gehirn aus der Gruppe der Alzheimerpatienten wurde als Braak Stadium III+IV eingestuft und in der Folge nicht für die Untersuchung von isokortikalen Hirnregionen herangezogen. Das Durchschnittsalter der Individuen in der Kontrollgruppe lag bei 55 Jahren und reicht von 19 bis 84 Jahren. In der Gruppe der Alzheimerpatienten lag das Durchschnittsalter bei 80 Jahren und reicht von 64 bis 92 Jahren (Tabelle 1).

Der Umgang mit dem verwendeten Autopsiegewebe wurde von der Ethikkommission der Universität Leipzig genehmigt.

Tabelle 1

Kontrollen	Material	Geschlecht	erreichtes Alter (a)	Gewicht d. Gehirns (g)	Post-Mortem-Zeit (h)	klinische Diagnosen	Braak Stadium
1	Area 22	männlich	42	1320	20	hämorrhagischer Schock, Sepsis	Kontrolle
2	Area 22+A.H.+E.K.	männlich	45	1560	48	Karzinom der Zunge	Kontrolle
3	Area 22	männlich	65	1360	24	hämorrhagischer Schock	Kontrolle
4	Area 22	männlich	67	1420	56	Rektumkarzinom, Lebersversagen	Kontrolle
5	Area 22	männlich	48	1580	48	nicht verfügbar	Kontrolle
6	Area 22	männlich	73	1450	24	Herz-Kreislauf-Versagen	Kontrolle
7	A.H.+E.K.	männlich	19	1210	42	T-Zell-Lymphom, Multiorganversagen	Kontrolle
8	A.H.+E.K.	weiblich	55	1230	10	Chronische Bronchitis, Herz-Kreislauf-Versagen	Kontrolle
9	A.H.+E.K.	männlich	59	1760	38	Pankreaskarzinom, Lebersversagen, Niereninsuffizienz	Kontrolle
10	A.H.	männlich	36	1430	30	Kardiogener Schock	Kontrolle
11	A.H.+E.K.	weiblich	84	1150	12	Parkinson	Kontrolle
12	A.H.+E.K.	männlich	65	1400	44	Kardiogener Schock	Kontrolle
Ø		10/2	55	1405	33		
<b>Alzheimer</b>							
1	Area 22	männlich	n.v.	1490	82	AD, Pneumonie, Herz-Kreislauf-Versagen	V / VI
2	Area 22	weiblich	70	1200	32	AD, Mammakarzinom, Herz-Kreislauf-Versagen	V / VI
3	Area 22	männlich	86	1300	9	AD, Lungenembolie	VI
4	Area 22	weiblich	64	1170	32	AD, Herz-Kreislauf-Versagen	V / VI
5	Area 22	weiblich	82	950	24	AD, Herz-Kreislauf-Versagen	V / VI
6	Area 22 + A.H.	weiblich	88	1180	48	AD, Lungenembolie	V / VI
7	A.H.+E.K.	weiblich	90	1200	72	AD, Herz-Kreislauf-Versagen	V / VI
8	A.H.+E.K.	weiblich	73	1310	72	AD, Herz-Kreislauf-Versagen	V / VI
9	A.H.+E.K.	männlich	78	1260	27	AD, Prostatakarzinom, Herz-Kreislauf-Versagen	V / VI
10	A.H.+E.K.	weiblich	81	1150	18	AD, Herz-Kreislauf-Versagen	V / VI
11	A.H.	weiblich	92	1200	48	AD, Pneumonie, Parkinson	V / VI
12	A.H.+E.K.	männlich	76	n.v.	28	AD, Herz-Kreislauf-Versagen	III-IV
Ø	A.H. = Ammonshorn E.K. = entorhinaler Kortex	4/8	80	1219	41	n.v. = nicht verfügbar	

## 2.2. Anfertigung von Gefrierschnitten

Aus dem in 4% Paraformaldehydlösung gelagerten Hirngewebe wurden zunächst 15 mm dicke Gewebeblöcke herausgeschnitten. Die Präparation erfolgte in der Frontalebene unter Zuhilfenahme des Atlas of the human brain (Mai *et al.*, 2004). Anschließend wurde dieses Gewebe über 3 Tage in 15% und später in 30% Saccharoselösung zur Kryoprotektion überführt und in dieser Lösung bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert. Am Schlittenmikrotom SM2000R (Leica) wurden bei einem Schnittwinkel von 8° anschließend 30 µm dicke Serienschnitte bei -28°C angefertigt und in einer 0,1 M, phosphatgepufferten (pH = 7,4) Salzlösung (PBS) den weiteren histochemischen und immunhistochemischen Markierungen zugeführt.



### 2.3. Kresylviolett-Färbung nach Nissl:

Die Kresylviolett-Färbung dient der Darstellung von Neuronen. Bei dieser Färbung lagert sich der basische Farbstoff an saure Zellbestandteile an und bindet hauptsächlich an Nukleinsäuren im Zellkern und im endoplasmatischen Retikulum. Der wasserlösliche Farbstoff liegt zunächst im Überschuss vor und wird anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe teilweise wieder ausgewaschen (Differenzierung).

Für diese Färbemethode wurden frei flottierende Gewebeschnitte in drei Spülgängen in PBS jeweils 5 Minuten gewaschen und anschließend auf mit Eiweißglyzerin beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden anschließend auf einer Heizplatte bei 35°C getrocknet, wodurch eine Haftung des Gewebes an die Objektträger erreicht wurde. Um Salzreste zu entfernen, erfolgte eine 5 minütige Spülung in destilliertem Wasser. Über eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96% Alkohol) wurden die Schnitte dann in 96% Alkohol für 30 Minuten nachfixiert und anschließend auf gleichem Wege zurück in destilliertes Wasser überführt. Daraufhin folgte die Färbung für 10 Minuten in 0,1% Kresylviolettlösung und Differenzierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, zweimal 96%, 100% Alkohol). Zwei weitere Inkubationen in 1-Propanol (Optal) und Xylol entfernten letzte Wasserrückstände. Abschließend wurden die Schnitte mit DePex (Serva) eingedeckt und bei Zimmertemperatur getrocknet.

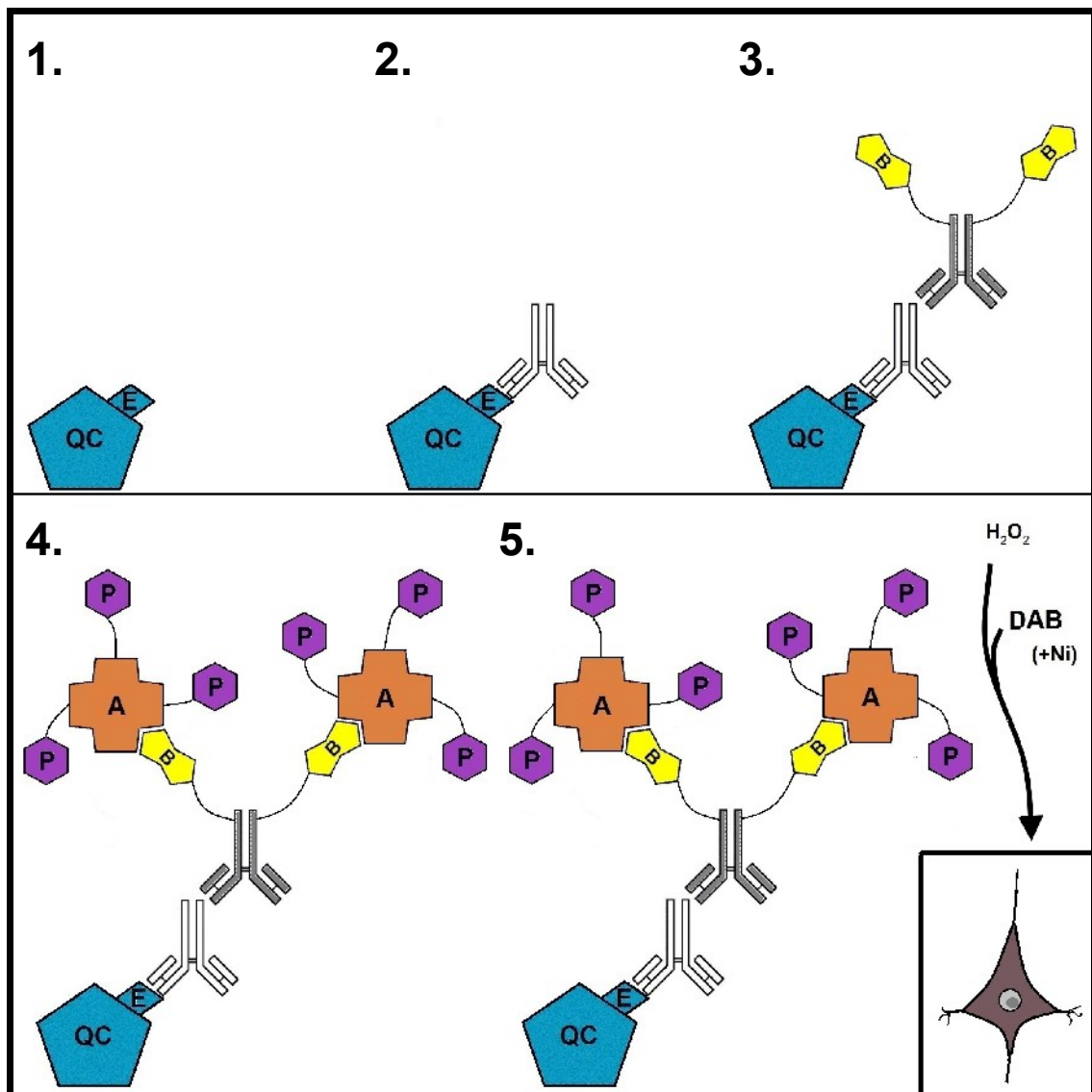
### 2.4. Immunhistochemie

Die indirekte Immunhistochemie erlaubt es, das zelluläre Verteilungsmuster des zu detektierenden Moleküls im Gewebeschnitt zu untersuchen und stellte für die hier untersuchten Fragestellungen die Methode der Wahl dar. Auf Grund der zentralen Stellung dieser Methode für diese Arbeit wird neben der Beschreibung einzelner Arbeitsschritte im Folgenden auch auf den grundlegenden Mechanismus der immunhistochemischen Detektion eingegangen.

In einem ersten Arbeitsschritt wurden Reste von Saccharose durch dreimaliges Waschen der Gewebeschnitte in PBS-T (PBS mit Zusatz von 0,05% Tween 20 (Sigma Aldrich)) entfernt. Alle Spülgänge erfolgten grundsätzlich für 10 Minuten. Um die endogene Peroxidase-Aktivität des Gewebes zu unterdrücken, wurden die Gewebeschnitte für 60 Minuten in einer 2% Wasserstoffperoxid enthaltenden 60%igen-Methanollösung

gewaschen. Nach einem Spülgang in PBS-T, erfolgte für 60 Minuten die Inkubation der Gewebeschnitte in einer Blockierlösung (Blocker A), bestehend aus 2% Rinderserum-Albumin, 0,5% Eselserum und 0,3% Casein gelöst in PBS-T, um unspezifische Bindungen der Antikörper an das Zielgewebe zu unterdrücken. Die Schnitte wurden anschließend für 48 Stunden bei 4°C mit einem in Blocker A gelösten, primären Antikörper inkubiert, der spezifisch an das Zielprotein (hier QC oder pE-Abeta) bindet (Antikörper und Verdünnung siehe Tabelle 2). Nach zwei Tagen wurden die Schnitte zunächst dreimalig in PBS-T gespült und anschließend mit einem sekundären, gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichteten, Antikörper für 60 Minuten inkubiert. An die verwendeten Sekundärantikörper sind Biotin-Moleküle kovalent gebunden und diese Komplexe wurden immer in 2 Teilen PBS-T und 1 Teil Blocker A gelöst und 1:1000 verdünnt. Nach drei weiteren Spülschritten in PBS-T wurden die Gewebeschnitte für 60 Minuten mit ExtrAvidin (Sigma-Aldrich), einem Komplex aus Avidin und kovalent gebundener Meerrettichperoxidase in der Verdünnung 1:2000 inkubiert. Das Avidinmolekül verfügt über 4 hochaffine Bindungsstellen für Biotin und lagert sich an dieses an. Durch drei weitere Spülschritte in PBS-T wurden unspezifisch gebundene ExtrAvidin-Reste ausgewaschen und die Gewebeschnitte in eine 0,05 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-gepufferte Salzlösung (TRIS-Puffer) überführt (pH=8,0). Der im Anschluss stattfindende Färbeschritt erfolgte in einer Mischung aus 5 ml TRIS-Puffer, 2 mg 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB, Sigma-Aldrich), 20 mg Nickelammoniumsulfat-6-hydrat (Ni) und 2,5 µl 30% Wasserstoffperoxid. Dabei wird Wasserstoffperoxid durch die Meerrettichperoxidase umgesetzt, so dass die bei dieser Disproportionierungsreaktion freiwerdenden Protonen DAB oxidieren und polymerisieren.

Immunhistochemische Darstellungen, die das Enzym QC detektieren sollten, wurden immer in Anwesenheit von Ni durchgeführt. Nickel wird hierbei in das wachsende DAB-Polymer eingebaut und gibt dem Färbeprodukt eine dunkelviolette Farbe. Wenn pE-Abeta dargestellt werden sollte, wurde TRIS-Puffer (pH=7,6) verwendet und auf Ni verzichtet, woraus eine Braunfärbung der Immunmarkierung folgte. Das zu Grunde liegende Prinzip dieser Methode ist in Abb. 2 schematisch dargestellt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der indirekten Immunhistochemie wie sie als Verifikationsmethode zur Darstellung des Enzyms Glutaminylzyklase (QC) in Neuronen zur Anwendung kam.

Das Zielgewebe wird hierbei zunächst mit einem primären Antikörper (*weiß*) inkubiert, der an einen kleinen Molekülabschnitt (**E**. Epitop) der Glutaminylzyklase (**QC**) spezifisch bindet (**2**). Im Anschluss erkennt ein kovalent mit Biotin (**B**) verknüpfter zweiter Antikörper (*grau*) das Fc-Fragment des ersten Antikörpers und bindet an diesen (**3**). In einem weiteren Schritt lagert sich das mit Meerrettichperoxidase (**P**) gekoppelte Glykoprotein Avidin an das Biotin an (**4**). Durch Hinzugabe von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) entsteht bei der Umsetzung durch die Meerrettichperoxidase (**P**) in Anwesenheit von Diaminobenzidin (**DAB**) abschließend ein bräunliches Färbeprodukt (und durch zusätzliche Hinzugabe von Nickelammoniumsulfat-6-hydrat (**Ni**) ein dunkelviolettes Färbeprodukt) (**5**).

Grundsätzlich fanden farbgebende Schritte unter optischer Kontrolle statt und wurden bei der Darstellung von QC nach 5 Minuten und bei der Darstellung von pE-Abeta nach 7 Minuten durch jeweils zwei Spülgänge in TRIS-Puffer, PBS-T und PBS abgebrochen. Für Präparate, bei denen neben QC auch pE-Abeta dargestellt wurde, folgte im Anschluss an die letzten Spülgänge in PBS-T ein kompletter zweiter Zyklus, welcher mit der Inkubation in Blocker A einsetzte. Die zusätzliche Darstellung von pE-Abeta erlaubt es, die Ko-Lokalisation von QC und pE-Abeta in Plaques und Neuronen gegenüberzustellen (Abb. 3).

Anschließend wurden die Gewebeschnitte auf mit Eiweißglyzerin beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden, wie in Kapitel 2.3. beschrieben, auf einer Heizplatte bei 35°C getrocknet und 1 Minute in destilliertem Wasser gespült. Abschließend wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, 100% Alkohol) und ein dreifaches Toluolbad geführt und schließlich mit Entellan (Merck) eingedeckt. Grundsätzlich wurde bei jeder Serie eine negative Kontrolle mit entwickelt, welche an Stelle eines primären Antikörpers mit Blocker A inkubiert wurde. Ein tabellarisches Färbeprotokoll findet sich im Anhang (Kapitel 7.1.).

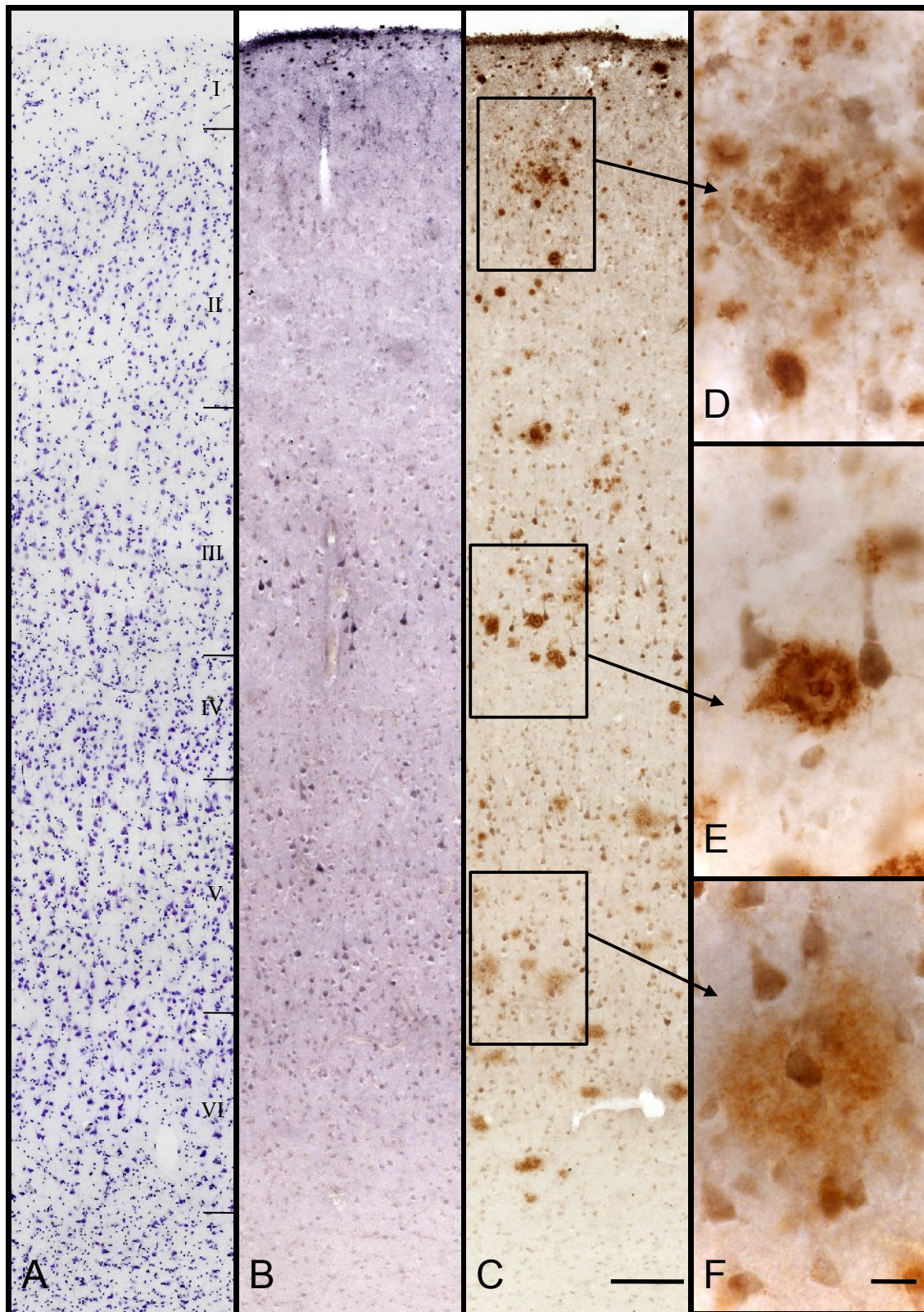
Tabelle 2

Verwendete Antikörper

<b>primäre AK</b>	<b>Immunogen</b>	<b>Spezies / Herkunft</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
A01	rekombinantes QC-Fragment – Mensch	Maus	Abnova	1 : 2000
B01	rekombinantes Holoprotein QC – Mensch	Maus	Abnova	1 : 500
1301	rekombinantes Holoprotein QC – Maus	Kaninchen	Probiobdrug	1 : 800
10269	rekombinantes Holoprotein QC – Maus	Ziege	Probiobdrug	1 : 250
pE-Abeta	pyroGlu modifiziertes Peptidfragment	Kaninchen	Synaptic Systems	1 : 500
<b>sekundäre AK</b>				
DaM	Immunoglobulin Typ G – Maus	Esel	Jackson IR	1 : 1000
DaRb	Immunoglobulin Typ G – Kaninchen	Esel	Jackson IR	1 : 1000
DaG	Immunoglobulin Typ G – Ziege	Esel	Jackson IR	1 : 1000

DaM = „Donkey-Anti-Mouse“; DaRb = „Donkey-Anti-Rabbit“; DaG = „Donkey-Anti-Goat“





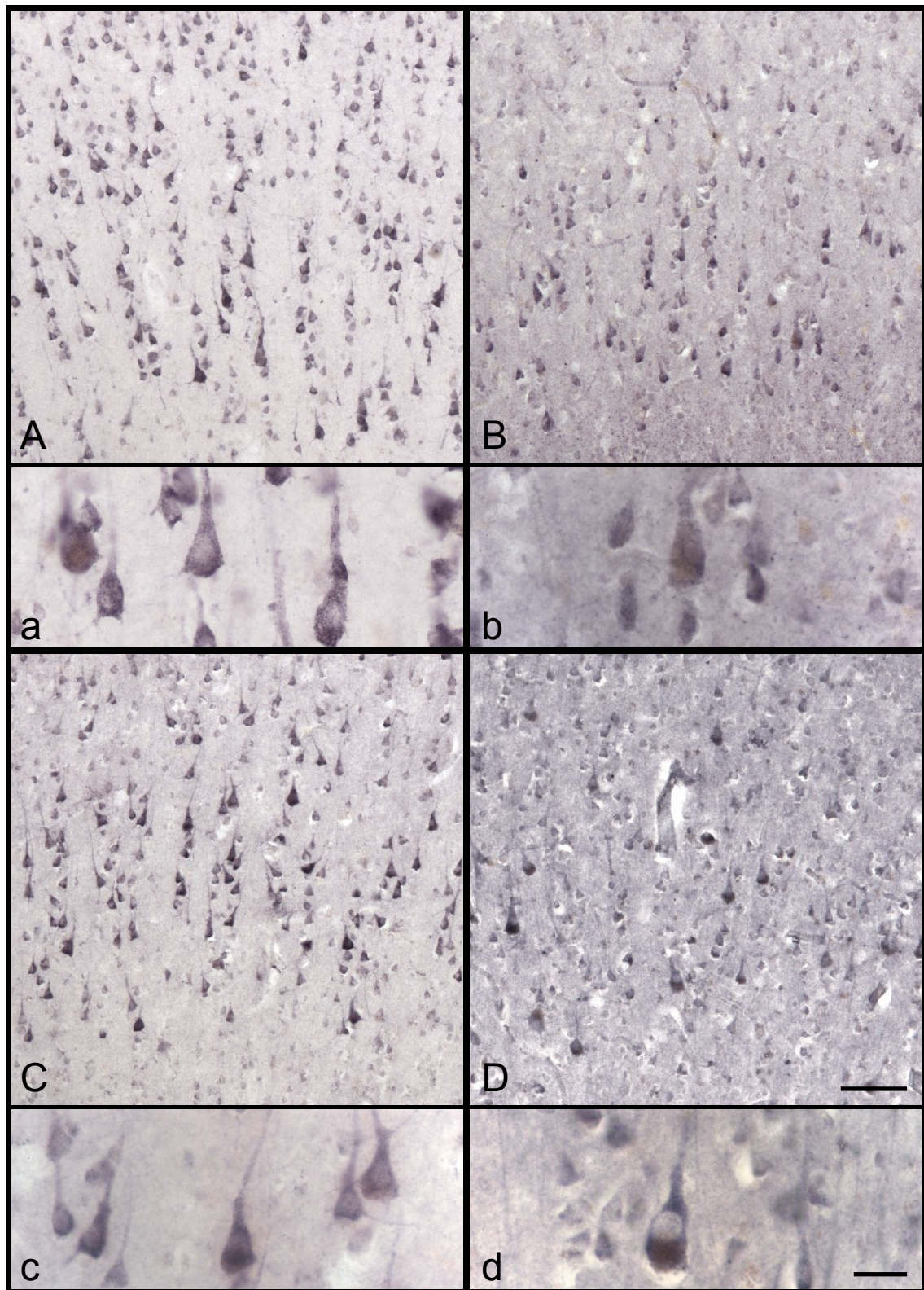
**Abbildung 3:** Die Darstellung von Neuronen durch Nisslfärbung (A), sowie immunhistochemische Färbung gegen QC (B und C) und gegen pE-Abeta (C) im temporalen Kortex (Area 22 nach Brodmann) eines Alzheimergehirns zeigt exemplarisch die Verteilung von QC und pE-Abeta Plaques (C,D,E und F). Maßstabsbalken in A,B,C 200  $\mu\text{m}$ , in D,E,F 20  $\mu\text{m}$

## 2.5. Vergleich von vier Anti-QC-Antikörpern

Um verlässliche Aussagen über die Lokalisation des Enzyms QC in kortikalen und subkortikalen Regionen des humanen Gehirns treffen zu können, war es notwendig die Eignung verfügbarer Anti-QC-Antikörper zu testen. Von den 5 Hirnregionen: temporaler Kortex (Area 22 nach Brodmann), okzipitaler Kortex (Areae 17 und 18 nach Brodmann), motorischer Kortex (Area 4 nach Brodmann), Substantia nigra und der Hippocampusformation wurden Serienschnitte angefertigt und auf diesen QC durch einen von vier verfügbaren Anti-QC-Antikörpern dargestellt (Tabelle 2).

Alle vier Antikörper detektieren QC vorwiegend im Zytosol von großen Pyramidenneuronen und zeigen in den Serienschnitten ein sehr ähnliches Bild in Bezug auf die Lokalisation und schichtspezifische Verteilung der QC-Immunreaktivität (Abb. 4). Das konsistente Bild, welches alle verwendeten Anti-QC Antikörper in den vergleichenden immunhistochemischen Darstellungen zeigten, spricht für die Spezifität jedes einzelnen Antikörpers. Der Antikörper A01 (Abnova) zeigte über alle getesteten Hirnregionen hinweg die klarsten Ergebnisse mit dem besten Signal-Rausch-Verhältnis (Abb. 4A) bei einem hohen Verdünnungsgrad (1:2000), weshalb für die Anfertigung aller weiteren Färbungen ausschließlich der Antikörper A01 verwendet wurde.





**Abbildung 4:** Immunhistochemische Detektion von Neuronen des okzipitalen Kortex (Area 17/18 nach Brodmann) durch vier verschiedene Anti-Glutaminylylzyklase-Antikörper an Folgeschnitten eines Kontrollgehirns. Alle Antikörper detektieren QC vorwiegend im Zytosol, sichtbar an den stark gefärbten Pyramidenneuronen in Lamina III. (A,a). A01, (B,b). 1301, (C,c). B01, (D,d). 10269. Maßstabsbalken für A, B, C, D 200  $\mu\text{m}$ , a, b, c, d 50  $\mu\text{m}$ .

## 2.6. Zählmethodik

Um eine quantitative Auswertung der Neuronenzahlen im temporalen und entorhinalen Kortex sowie im Hippocampus durchzuführen, wurden von allen mit Kresylviolett und immunhistochemisch gegen QC gefärbten Präparaten hochauflösende Übersichtsaufnahmen erstellt. Hierfür wurde das Mikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss) mit dem Kameraaufsatz AxioCam MRC (Carl Zeiss) und einem motorisierten XY-Tisch (Märzhäuser) in Verbindung mit der Software AxioVision 4.6.3 verwendet (Carl Zeiss). Die Präparate wurden mit dem 10x Objektiv automatisiert mäanderförmig abgefahren und die entstandenen Einzelbilder mit der Softwarefunktion MosaiX zu einer Bilddatei zusammengeführt. Alle Aufnahmen wurden unter vergleichbaren Bedingungen angefertigt, so dass beispielsweise die Belichtungszeit immer bei 9,9 ms lag. Die eigentlichen Zählungen erfolgten unter Verwendung der Software AxioVision 3.1, wobei für alle Bilddateien die Anzeigeeinstellungen: Helligkeit -0,5; Kontrast 2,5 und Gamma 1,6 verwendet wurden. Dabei wurden für Präparate des temporalen Kortex gleich große Rechtecke mit einer Mindestbreite von 1 mm über die gesamte Kortextiefe gelegt. Die Höhe dieser Rechtecke wurde so gewählt, dass einzelne oder mehrere Rechtecke den Kortexschichten des temporalen Kortex zugeordnet werden konnten.

Für den entorhinalen Kortex wurde auf Grund einer geringeren Kortextiefe für die Flächeneinteilungen Vielecke mit einer größeren Breite gewählt. Da zwischen den Kortexschichten V und VI keine klare Abgrenzung möglich war, wurde für die Zählung nicht zwischen Neuronen dieser Kortexschichten differenziert. Für die spätere Auswertung wurden im temporalen Kortex Neurone in den Kortexschichten II bis VI gezählt und im entorhinalen Kortex in den Schichten II, III und V+VI, da im *Stratum moleculare* vorwiegend Gliazellen und keine Neurone zu finden waren und die Schicht IV des entorhinalen Kortex eine weitgehend zellfreie Faserschicht darstellt. Als Neurone wurden nur Zellen in den begrenzten Flächen gezählt, deren Soma einen Durchmesser größer als 8 µm hatte und mindestens ein zugehöriger Dendrit sichtbar war. In immunhistochemischen Präparaten wurde zwischen schwach- und stark-QC-positiven Neuronen differenziert (Abb. 5 und 6). Letztere wurden als stark-QC-positiv gezählt, wenn sich ihr Zellkörper bei maximierten Anzeigeeinstellungen: Helligkeit 2; Kontrast 10 und Gamma 3 noch immer deutlich vom Hintergrund abhob. Da die QC-Immunreaktivität in Neuronen des Subikulums und der CA1 Region des Ammonshorns sehr kräftig war und nicht in dem Maße variierte, wie in den kortikalen Regionen,

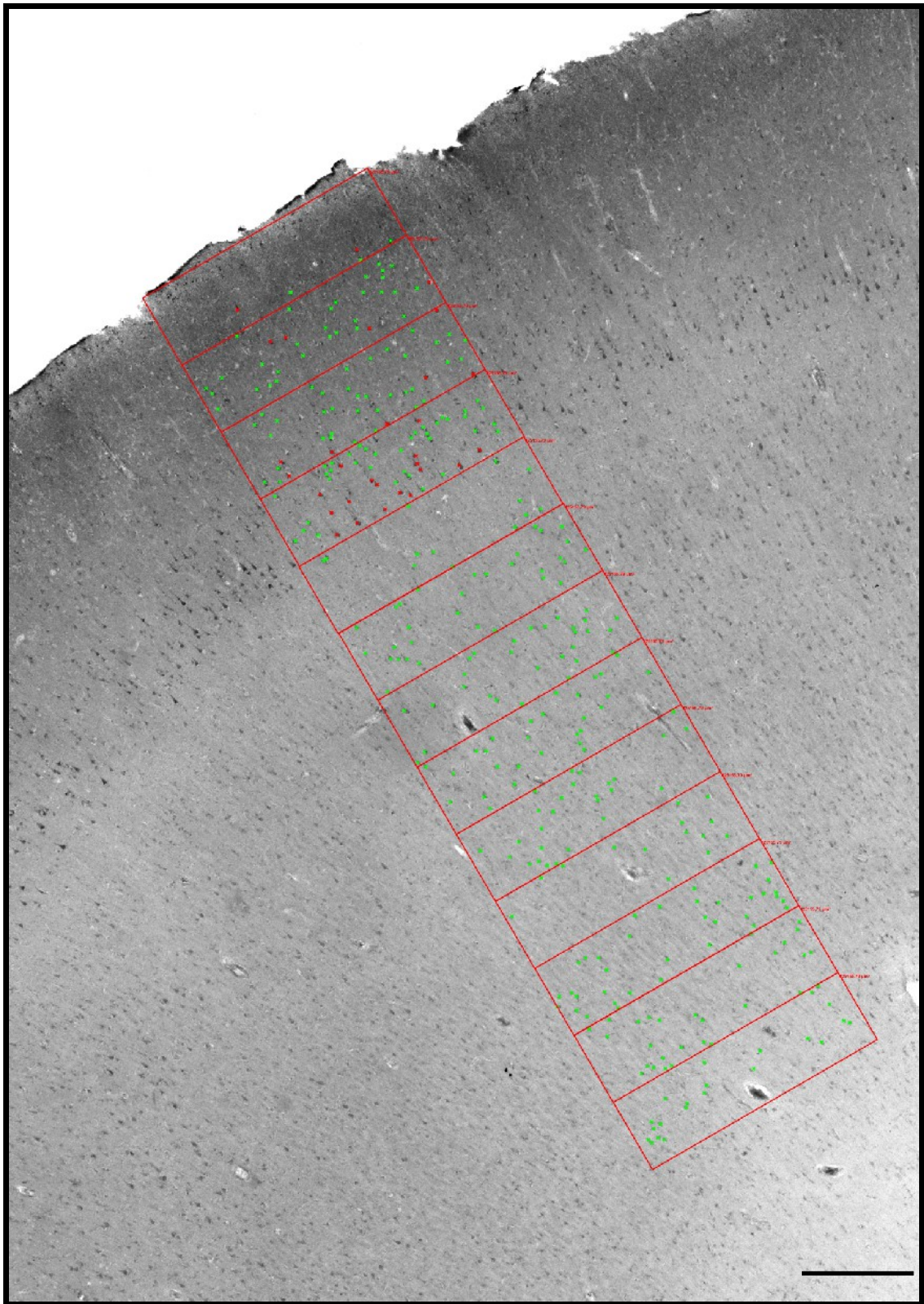


wurde hier von einer Differenzierung in schwach- und stark-QC-positive Neurone abgesehen (Abb. 6).

## 2.7. Verwendete Hard- und Software

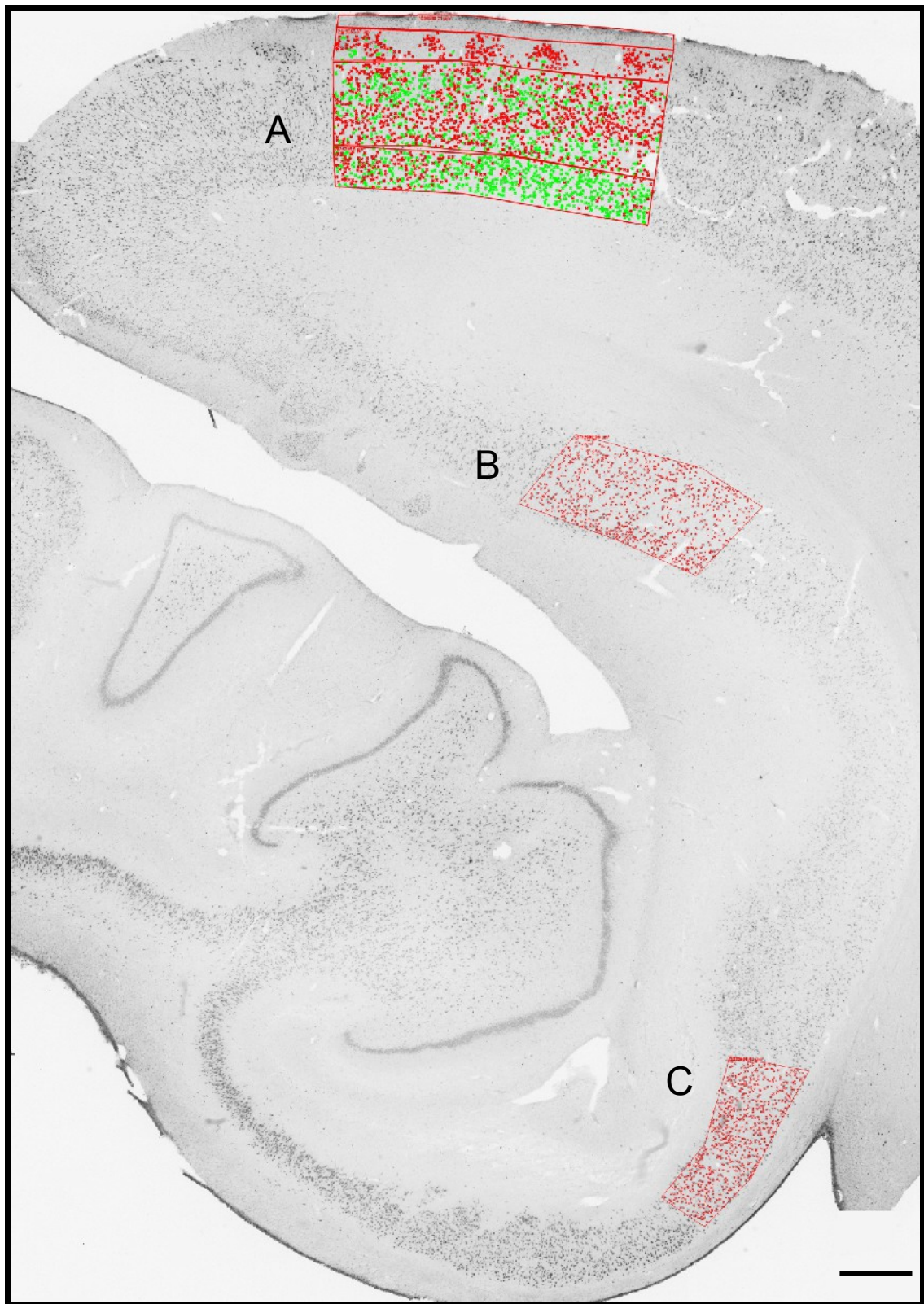
Für die Auswertung der Präparate wurde das Mikroskop Axiovert 200M (Carl Zeiss) mit Zubehör verwendet (Kapitel 2.6.). Die fotografische Dokumentation für die dargestellten Abbildungen erfolgte am Mikroskop Axioplan 2 (Carl Zeiss) mit dem Kameraaufsatz Axiocam HRC (Carl Zeiss). Bildschärfe und Tonwertkorrekturen wurden mit Photoshop 9 (Adobe Systems) bearbeitet. Für die Auswertung der erhobenen Daten wurde die Statistiksoftware Prophet 5.0 verwendet. Das Signifikanzniveau lag für alle Fragestellungen bei  $p < 0,05$ .

Auf Grund der vorhandenen Datensätze und der Anzahl der Messwerte wurde für die statistische Testung der Datensätze aus dem temporalen Kortex, dem Subikulum und der CA1 Region des Hippocampus der Student's-t-Test und für die Testung der Datensätze des entorhinalen Kortex der Mann-Whitney-Test verwendet. Als Maß der Streuung wird im Ergebnisteil neben dem arithmetischen Mittel immer die Standardabweichung (SD) angegeben. Alle Diagramme, Layouts und schriftlichen Ausführungen wurden mit OpenOffice 3.3 erstellt. Die in Abb. 2 und 3 dargestellten Schemata wurden mit Microsoft Paint 6.1 und Paint.net 3.3 erstellt.



**Abbildung 5:** Quantitative Auswertung der Neurone des temporalen Kortex (Area 22 nach Brodmann) am Beispiel eines immunhistochemisch QC-gefärbten Kontrollgehirns. Gezählt wurden schwach gefärbte (*grüne Punkte*) sowie stark gefärbte Neurone (*rote Punkte*) in den begrenzten Flächen (*rote Rechtecke*) mit definiertem Flächeninhalt. Die Quantifizierung erfolgte über die gesamte Kortextiefe. *Maßstabsbalken* 500 µm





**Abbildung 6:** Quantitative Auswertung der Neurone des entorhinalen Kortex (A) sowie Neurone des Subikulums (B) und des Ammonshorns (C) am Beispiel eines immunhistochemisch QC-gefärbten Kontrollgehirns. Gezählt wurde analog zu der in **Abb. 5** dargestellten Methodik. Für Neurone des Subikulums und des Ammonshorns wurde nicht zwischen stark und schwach gefärbten Neuronen unterschieden. *Maßstabsbalken 1 mm*

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Neuronendichten der untersuchten Hirnregionen in

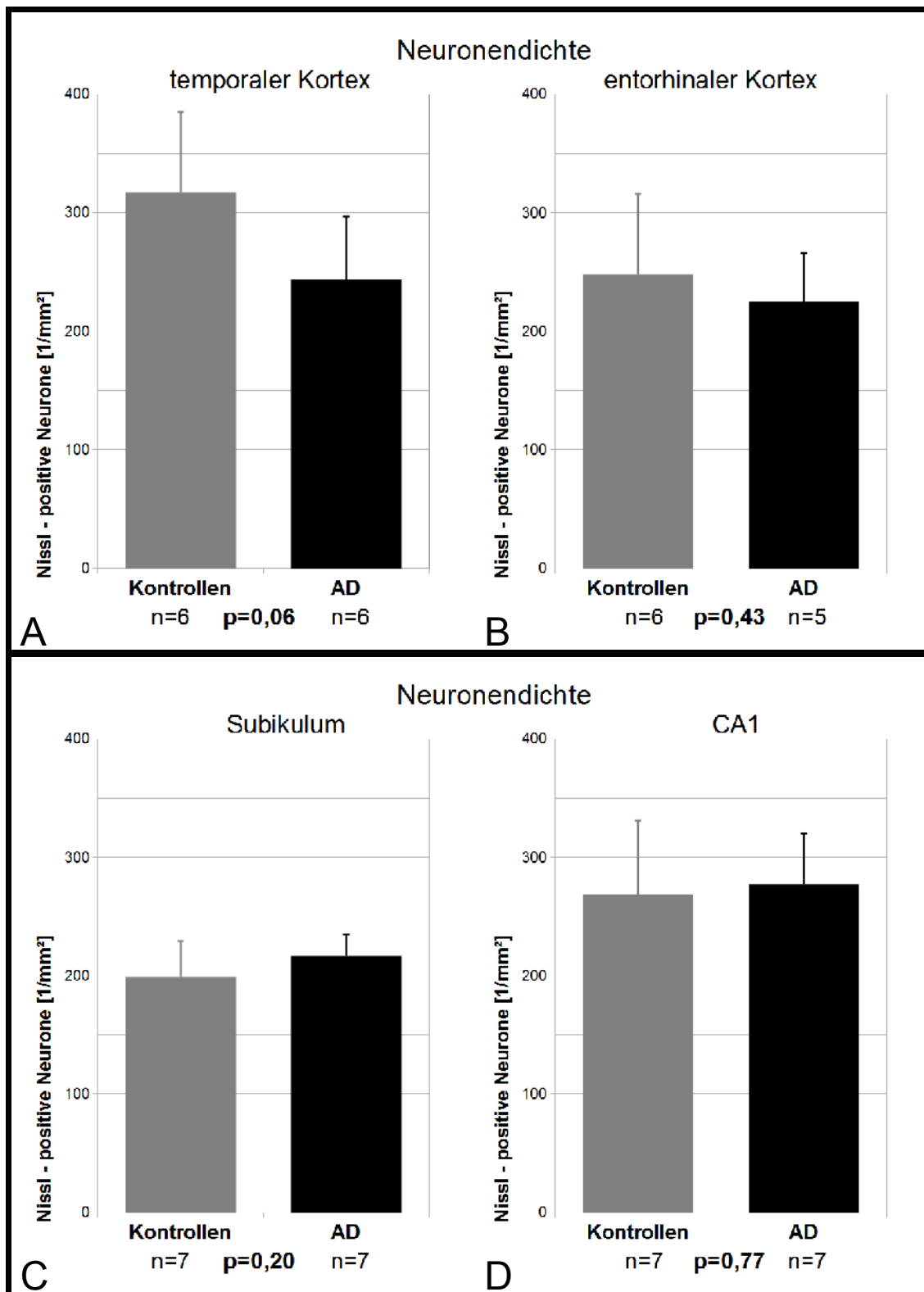
##### Alzheimer- und Kontrollgehirnen

Die AD geht mit einem Verlust von Nervenzellen einher, der makroskopisch als Atrophie besonders in den Regionen des Assoziationskortex, des entorhinalen Kortex und des Hippocampus prominent ist.

Aus diesem Grund, und um spätere Ergebnisse, die sich auf spezifische Neuronenpopulationen beziehen, besser einordnen zu können, wurden die in den untersuchten Hirnregionen gefundenen Neuronendichten gegenübergestellt und statistisch ausgewertet (Abb. 7). Im temporalen Kortex findet sich eine mittlere Neuronendichte von 317 ( $\pm 68$  SD) Neuronen pro  $\text{mm}^2$  in Gehirnen der Kontrollgruppe ( $n=6$ ) und eine mittlere Neuronendichte von 244 ( $\pm 53$  SD) Neuronen pro  $\text{mm}^2$  in Gehirnen von Alzheimerpatienten ( $n=6$ ). Eine Signifikanz wird in Bezug auf die Neuronendichten im temporalen Kortex zwischen Alzheimer- und Kontrollgehirnen knapp verfehlt ( $p=0,06$ ), aber es zeichnet sich ein Trend zu einer erniedrigten Neuronendichte in Gehirnen von Alzheimerpatienten ab (Abb. 7A).

Die Neuronendichten des entorhinalen Kortex, des Subikulums und des Ammonshorns (CA1) wurden entsprechend der in Abb. 6 dargestellten Zählmethodik in der Mehrzahl der Fälle am selben Präparat erhoben. Im entorhinalen Kortex finden sich im Mittel 225 ( $\pm 68$  SD) Neurone pro  $\text{mm}^2$  in Gehirnen von Alzheimerpatienten ( $n=5$ ) und 248 ( $\pm 41$  SD) Neurone pro  $\text{mm}^2$  in Gehirnen von Kontrollen ( $n=6$ ) (Abb. 7B). Mit der Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p=0,43$  unterscheiden sich die Neuronendichten zwischen diesen Gruppen im entorhinalen Kortex nicht signifikant. Auch die im Subikulum und der CA1 Region des Ammonshorns in diesen Gruppen gefundenen Neuronendichten unterscheiden sich nicht signifikant ( $p=0,20$ ;  $p=0,77$ ). Dabei finden sich im Subikulum 199 ( $\pm 30$  SD) Neurone pro  $\text{mm}^2$  in Gehirnen von Kontrollen ( $n=7$ ) und 217 ( $\pm 18$  SD) Neurone pro  $\text{mm}^2$  in Gehirnen von Alzheimerpatienten ( $n=7$ ) (Abb. 7C).

Im Ammonshorn (CA1) lag die mittlere Neuronendichte bei 269 ( $\pm 62$  SD) Neuronen pro  $\text{mm}^2$  in Gehirnen von Kontrollen ( $n=7$ ) und 277 ( $\pm 43$  SD) Neuronen pro  $\text{mm}^2$  in Gehirnen von Alzheimerpatienten ( $n=7$ ). Zwischen den untersuchten Alzheimer- und Kontrollgehirnen zeigt sich in allen vier Hirnregionen damit kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die gefundenen Neuronendichten.



**Abbildung 7:** Vergleich der durch Nissl-Färbungen ermittelten Neuronendichten im temporalen (Area 22 nach Brodmann) (A) und entorhinalen Kortex (Area 28 nach Brodmann) (B) sowie Subikulum (C) und CA1 Region des Ammonshorns (D) zwischen Alzheimer- und Kontrollgehirnen. Für alle untersuchten Regionen findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen Alzheimer- und Kontrollgehirnen.

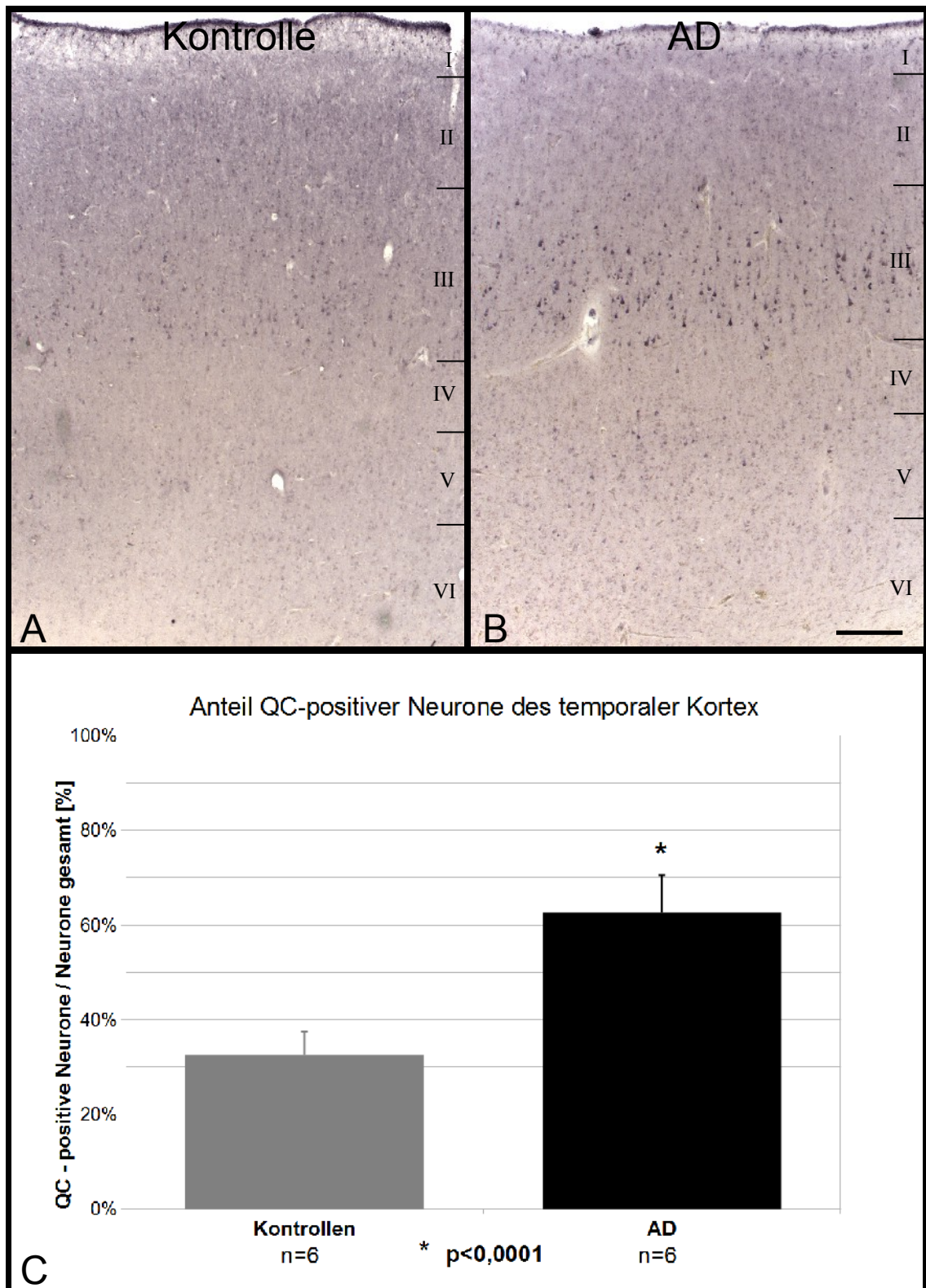
## 3.2. QC-Immunreaktivität in Alzheimer- und Kontrollgehirnen

### 3.2.1. QC-Immunreaktivität im temporalen Kortex

Als eines der ersten neokortikalen Areale ist die von Korbinian Brodmann zu Beginn des 20. Jahrhunderts als Area 22 definierte Region des Isokortex von AD-typischen Veränderungen betroffen und war daher in der Folge immer wieder Gegenstand intensiver Forschung. Um von der Neuronendichte unabhängige Aussagen treffen zu können, wurde die Anzahl durch Immunhistochemie QC-gefärbter Neurone (QC-positiv) zu der durch Kresylviolett-Färbung erhobenen Gesamtzahl aller Neurone ins Verhältnis gesetzt. Dieser Quotient gibt an, welcher Anteil der Neurone aus einer Hirnregion eine deutliche QC-Immunreaktivität zeigt und erlaubt auch bei ungleichen Neuronendichten einen Vergleich zwischen Präparaten aus Gehirnen von Patienten mit der Alzheimerschen Erkrankung und Kontrollen.

Im temporalen Kortex zeigt die Gegenüberstellung von Alzheimer- und Kontrollgehirnen (jeweils 6 Gehirne), dass QC hochsignifikant ( $p < 0,0001$ ) häufiger in Gehirnen von Alzheimerpatienten detektiert wird (Abb. 8). Im Mittel wird das Enzym QC in Gehirnen der Kontrollgruppe in 31,5% ( $\pm 5,0\%$  SD) aller Neurone gefunden, wohingegen 61,7% ( $\pm 7,8\%$  SD) aller Neurone in Gehirnen von Alzheimerpatienten eine deutliche QC-Immunreaktivität zeigen. Weiterhin ist auffällig, dass sich neben der Zahl der Neurone auch die Intensität der immunhistochemischen Färbung zwischen den Gehirnen von Alzheimerpatienten und Kontrollen unterscheidet (siehe Kapitel 3.3.1.).

Mit Ausnahme eines Falls wurden in den zusätzlich gegen pE-Abeta gefärbten Präparaten in allen Gehirnen der Alzheimergruppe, jedoch in keinem Kontrollgehirn, pE-Abeta Plaques und eine starke zytosolische pE-Abeta-Immunreaktivität der Neurone gefunden, wie sie in Abb. 3 exemplarisch dargestellt sind. Hier wird die schichtspezifische Verteilung von QC-positiven Neuronen und pE-Abeta Plaques in unterschiedlichen Plaquemorphologien deutlich. In dem als Ausnahme aufgeführten Gehirn eines Patienten mit AD wurde pE-Abeta allein zytosolisch, aber nicht in extrazellulären Plaques detektiert.



**Abbildung 8:** Vergleich des Anteils immunhistochemisch QC-positiver Neurone des temporalen Kortex (Area 22 nach Brodmann) zwischen einem Kontroll- (A) und einem Alzheimergehirn (B). Die statistische Auswertung aller Gehirne (C) zeigt, dass in den Gehirnen von Alzheimerpatienten im temporalen Cortex signifikant mehr Neurone eine QC-Immunreaktivität zeigen als in den Gehirnen von Kontrollen. (\*  $p < 0,0001$ ) Maßstabsbalken 1 mm



### 3.2.2. QC-Immunreaktivität im entorhinalen Kortex

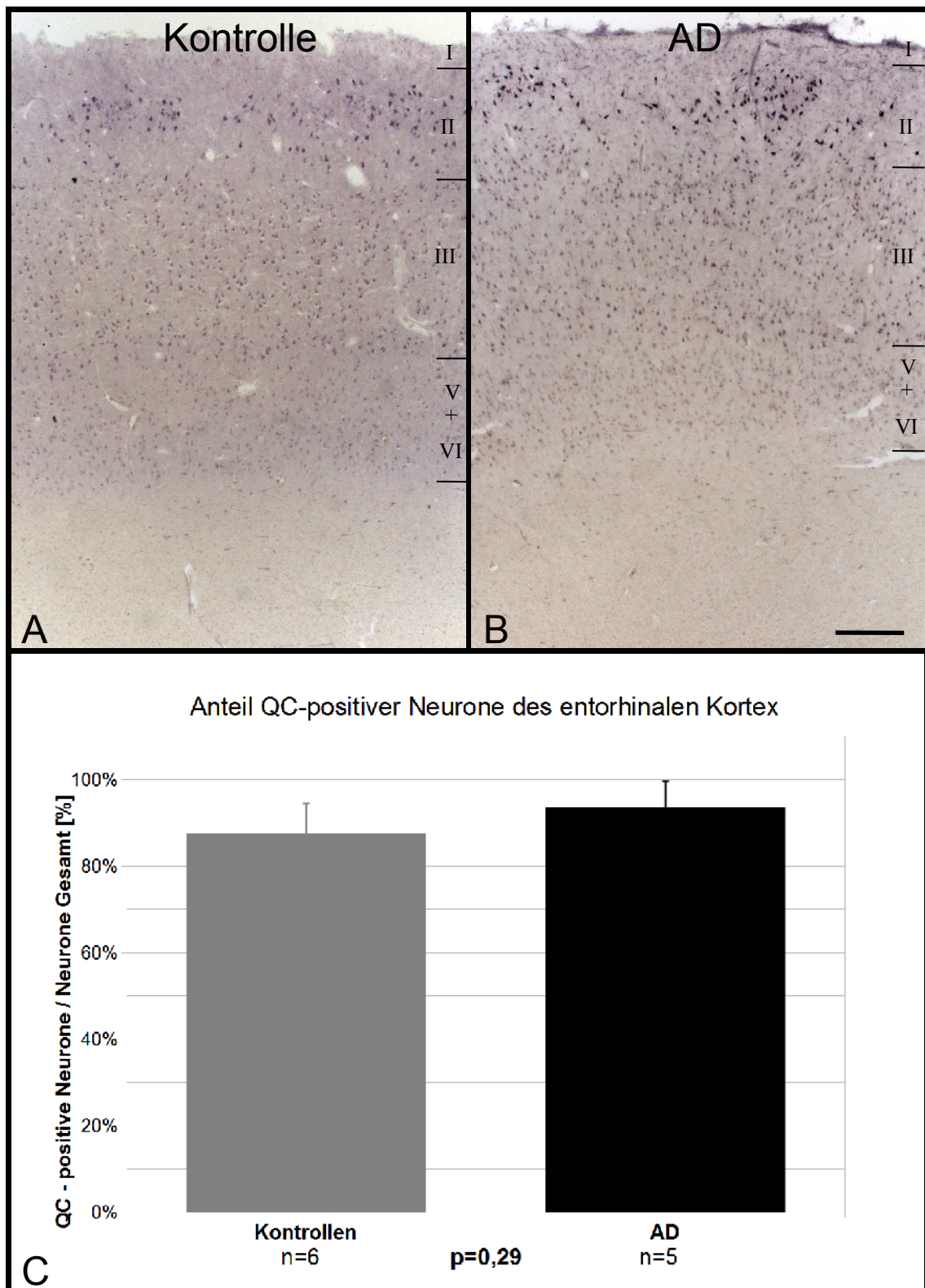
Der entorhinale Kortex gilt als wichtige Schaltstation zwischen Isokortex und Hippocampus und bildet eine Übergangszone zwischen dem phylogenetisch älteren Allokokortex und dem phylogenetisch eher jüngeren Isokortex und eine Pforte für den neokortikalen Informationsfluss in das limbische System (Braak und Braak, 1992).

Auf Grund seiner Zytoarchitektur konnte der entorhinale Kortex entsprechend der im temporalen Kortex angewandten Methodik untersucht werden (siehe Kapitel 3.2.1.).

Die Auswertung aller Gehirne erbrachte einen Anteil von 87,5% ( $\pm$  6,9% SD) QC-positiver Neurone in Gehirnen der Kontrollgruppe (n=6) und 92,6% ( $\pm$  8,0% SD) QC-positiver Neurone in Gehirnen von Alzheimerpatienten (n=5). Der prozentuale Anteil QC-positiver Neurone unterscheidet sich mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p=0,29$  statistisch nicht signifikant zwischen Alzheimer- und Kontrollgehirnen (Abb. 9).

Wie im temporalen Kortex zeigen auch Neurone im entorhinalen Kortex Unterschiede in Bezug auf die Intensität der immunhistochemischen Färbung zwischen Alzheimer- und Kontrollgehirnen, auf die in Kapitel 3.3.2. eingegangen wird. In den Gehirnen der Alzheimergruppe wurde pE-Abeta in den *Somata* der untersuchten Neurone und in 3 der 5 Fälle auch in Plaques mit starker Betonung der entorhinalen Schicht III detektiert. Hingegen waren in keinem der 6 Kontrollgehirne pE-Abeta Plaques vorzufinden (nicht dargestellt). Als zusätzlicher Befund wurde besonders im entorhinalen Kortex deutlich, dass in allen untersuchten Gehirnen neben Neuronen auch Mikro- und Astrogliazellen eine starke QC-Immunreaktivität zeigen. Dies wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein und ist deshalb hier nicht dargestellt.





**Abbildung 9:** Vergleich des Anteils immunhistochemisch QC-positiver Neurone des entorhinalen Kortex (Area 28 nach Brodmann) zwischen einem Kontroll (A) und einem Alzheimergehirn (B). Die statistische Auswertung aller Gehirne (C) zeigt keinen Unterschied in der Anzahl QC-immunreaktiver Neurone zwischen Alzheimer- und Kontrollgehirnen zeigen.

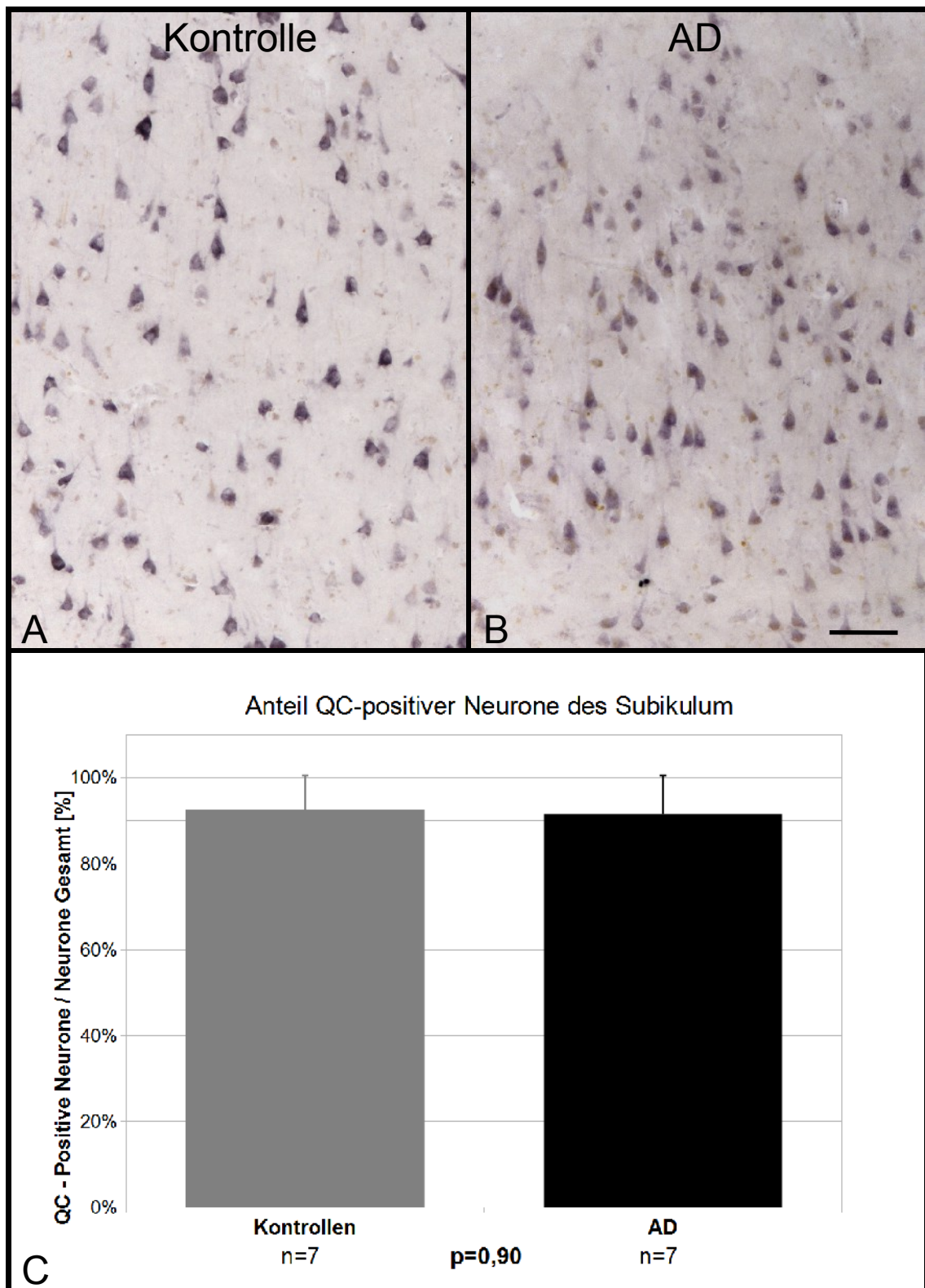
Maßstabsbalken 1 mm

### 3.2.3. QC-Immunreaktivität im Subikulum und Ammonshorn

Das Subikulum und die CA1 Region sind dafür bekannt, vulnerable Gebiete des Hippocampus zu sein und werden im Verlauf der AD und bei Hypoxie früh geschädigt (West *et al.*, 1994; Simic *et al.*, 1997; Duvernoy, 2005; von Gunten *et al.*, 2006). Auch für die Pathophysiologie der AD sind diese Regionen von starkem Interesse und wurden deshalb auf das Vorhandensein von QC-Immunreaktivität hin untersucht.

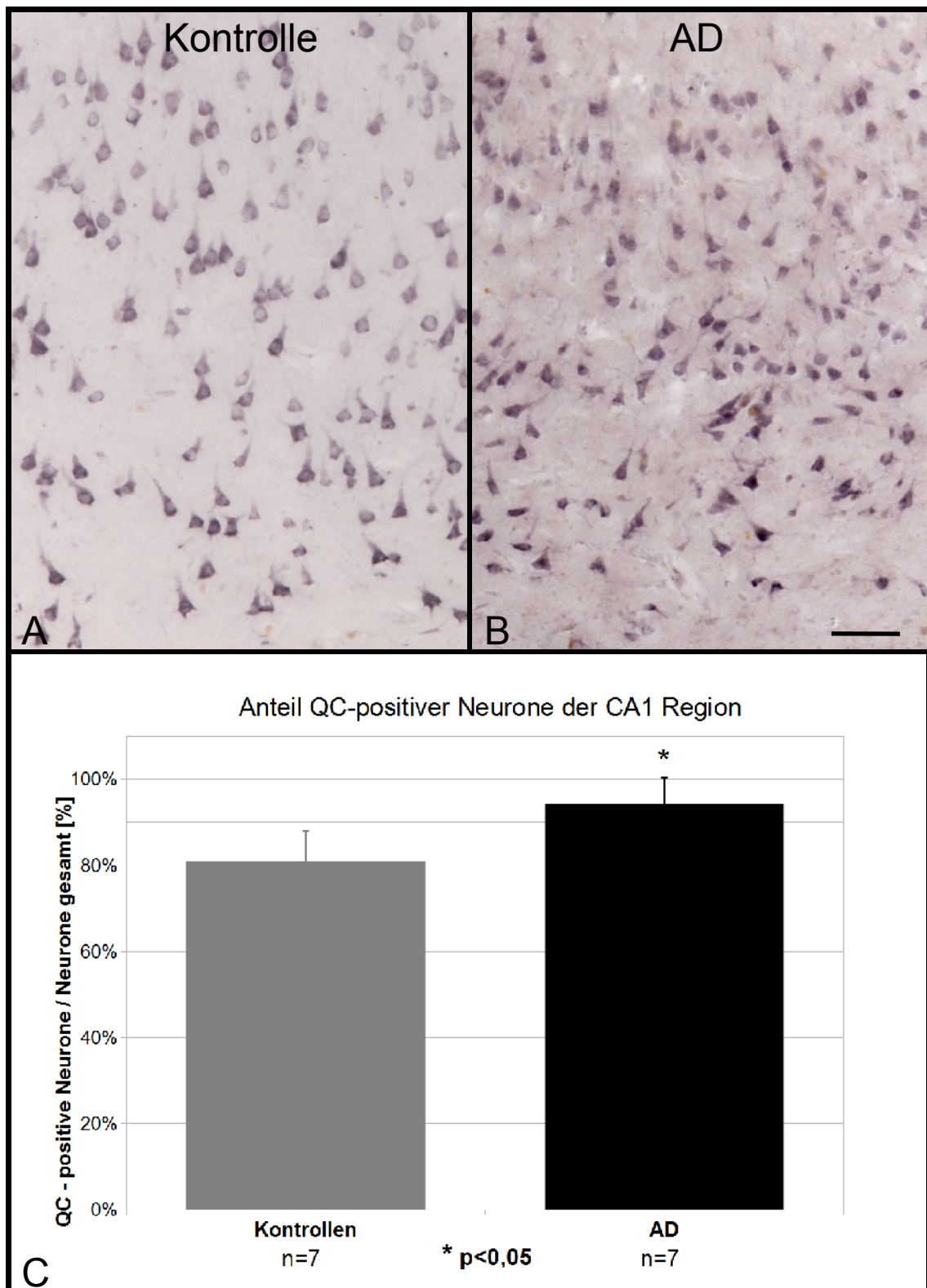
Wie im entorhinalen Kortex liegt der prozentuale Anteil QC-positiver Neurone in beiden Gruppen in diesen Regionen bei über 80%. Im Subikulum wird das Enzym QC im Mittel in 92,6% ( $\pm 9,6\%$  SD) aller Neurone in Gehirnen der Kontrollgruppe (n=7) und in 91,6% ( $\pm 9,3\%$  SD) aller Neurone in Gehirnen von Alzheimerpatienten (n=7) gefunden. Alzheimer- und Kontrollgehirne unterscheiden sich mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p=0,90$  nicht signifikant in Bezug auf den prozentualen Anteil QC-positiver Neurone (Abb. 10C). Im Gegensatz dazu weisen in der CA1 Region mit 94,4% ( $\pm 11,4\%$  SD) signifikant ( $p<0,05$ ) mehr Neurone in Gehirnen von Alzheimerpatienten (n=7) eine QC-Immunreaktivität auf als Neurone in Gehirnen der Kontrollgruppe (n=7) mit 81,0% ( $\pm 6,8\%$  SD) (Abb. 11).

Die Stärke der QC-Immunreaktivität in diesen beiden Regionen variiert nicht in dem Maß, wie es in den zuvor beschriebenen Kortextbereichen der Fall ist, sondern erscheint sowohl in Alzheimer- als auch Kontrollgehirnen annähernd homogen über die detektierten Neurone verteilt (Abb. 10A und B sowie 11A und B). pE-Abeta Plaques waren auch in diesen beiden Gebieten ausschließlich auf die Gehirne von Alzheimerpatienten beschränkt und traten wenn, dann nur vereinzelt auf (nicht dargestellt).



**Abbildung 10:** Vergleich des Anteils immunhistochemisch QC-positiver Neurone des Subikulums zwischen einem Kontroll- (A) und einem Alzheimergehirn (B). Die statistische Auswertung aller Gehirne (C) zeigt keinen signifikanten Unterschiede in der Anzahl immunhistochemisch QC-positiver Neurone zwischen Alzheimer- und Kontrollgehirnen.

Maßstabsbalken 200  $\mu\text{m}$



**Abbildung 11:** Vergleich des Anteils immunhistochemisch QC-positiver Neurone der CA1 Region des Ammonshorns zwischen einem Kontroll- (A) und einem Alzheimergehirn (B). Die statistische Auswertung aller Gehirne (C) zeigt, dass in Gehirnen von Alzheimerpatienten signifikant mehr Neurone eine QC-Immunreaktivität zeigen als in Gehirnen von Kontrollen.

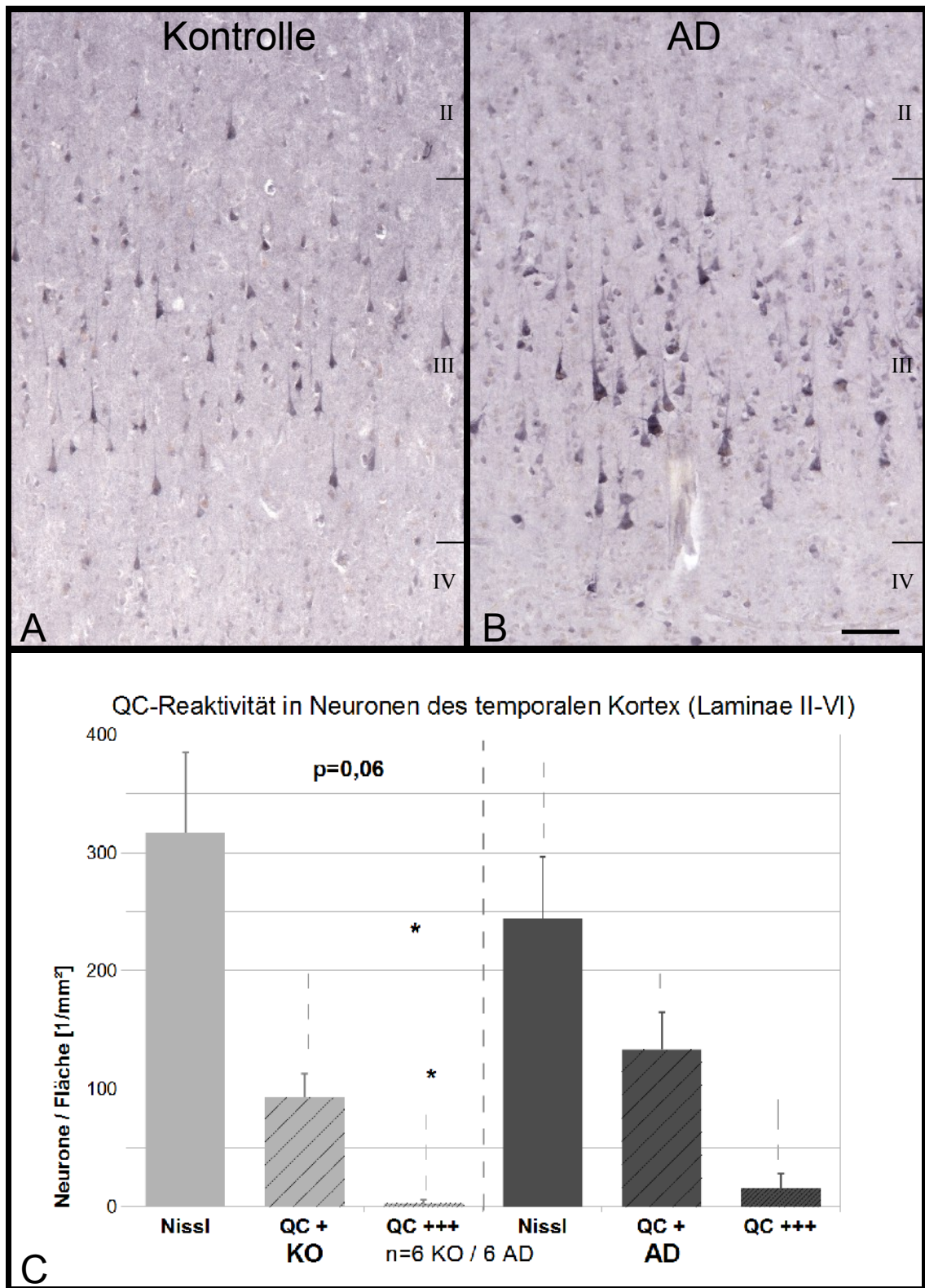
(\*  $p < 0,05$ ) Maßstabsbalken 200  $\mu\text{m}$

### 3.3. Stärke der QC-Immunreaktivität in Alzheimer- und Kontrollgehirnen

#### 3.3.1. Stärke der QC-Immunreaktivität im temporalen Kortex

Die QC-Immunreaktivität im temporalen Kortex variiert zwischen den Kortexschichten und zwischen einzelnen Neuronen teilweise stark. Aus diesem Grund wurde entsprechend der im Kapitel 2.6. beschriebenen Methodik zwischen Neuronen unterschieden, die eine starke, eine schwache oder keine QC-Immunreaktivität aufweisen. Auf diese Weise ist es möglich vergleichende Rückschlüsse auf den Gehalt von QC in den markierten Neuronen zu ziehen. Am stärksten wird dieser quantitative Unterschied in Bezug auf die QC-Immunreaktivität am Übergang von Kortexschicht III zu IV bei Neuronen des temporalen Kortex sichtbar (Abb. 12A und B). Nachdem in Kapitel 3.2.1. für den temporalen Kortex gezeigt werden konnte, dass der Anteil QC-positiver Neurone in den Gehirnen von Patienten mit AD signifikant höher liegt als in den Gehirnen von Kontrollen, gilt es im Folgenden zu klären, ob sich der QC-Gehalt in Neuronen aus Kontrollgehirnen von dem aus Gehirnen von Alzheimerpatienten unterscheidet. Hierzu wurde die Anzahl an stark- und schwach-QC-positiven Neuronen aus Alzheimer- und Kontrollgehirnen gegenübergestellt und statistisch ausgewertet. In den Gehirnen der Kontrollgruppe (n=6) zeigen durchschnittlich 3 ( $\pm$  3 SD) Neurone pro mm<sup>2</sup> eine starke und 93 ( $\pm$  20 SD) Neurone pro mm<sup>2</sup> eine schwache QC-Immunreaktivität, wohingegen in den Gehirnen von Alzheimerpatienten (n=6) durchschnittlich 16 ( $\pm$  12 SD) Neurone pro mm<sup>2</sup> eine starke und 133 ( $\pm$  32 SD) Neurone pro mm<sup>2</sup> eine schwache QC-Immunreaktivität zeigen. Nach statistischer Testung zeigt sich, dass in den Gehirnen von Alzheimerpatienten signifikant mehr Neurone eine starke QC-Immunreaktivität ( $p < 0,05$ ) und mehr Neurone eine schwache QC-Immunreaktivität ( $p < 0,05$ ) aufweisen als in Kontrollgehirnen (Abb. 12).





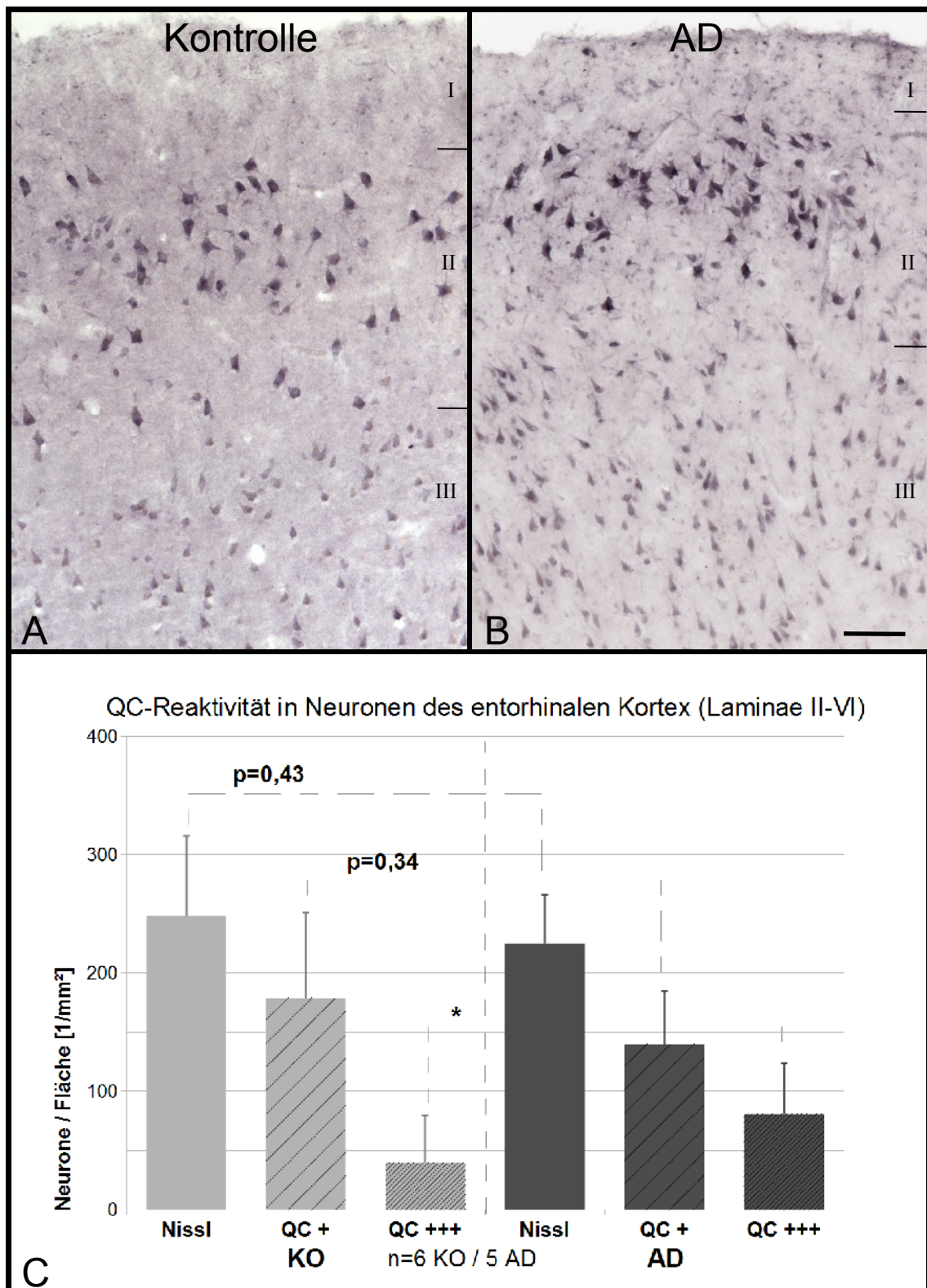
**Abbildung 12:** Die Anzahl stark-QC-gefärbter Neuronen (QC+++) und schwach-QC-gefärbter Neuronen (QC+) im temporalen Kortex (Area 22 nach Brodmann) ist in Gehirnen von Alzheimerkrankheit signifikant gegenüber denen in Kontrollgehirnen erhöht (C). In der Pyramidenzellschicht III zeigen besonders viele Neurone eine starke QC-Immunreaktivität (A und B).

(\*  $p < 0,05$ ) Maßstabsbalken 200  $\mu\text{m}$

### 3.3.2. Stärke der QC-Immunreaktivität im entorhinalen Kortex

Wie im temporalen Kortex zeigen auch die Neurone im entorhinalen Kortex unterschiedlich intensiv ausgeprägte QC-Immunreaktivität, sodass auch hier bei der Zählung zwischen Neuronen unterschieden wurde, die eine starke, eine schwache oder keine QC-Immunreaktivität aufweisen. Die stärksten Unterschiede in Bezug auf die QC-Immunreaktivität von Neuronen des entorhinalen Kortex werden am Übergang von Schicht II zu III sichtbar (Abb. 13A und B).

Nachdem für den entorhinalen Kortex kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Anteils QC-positiver Neurone in Alzheimer- und Kontrollgehirnen gefunden wurde (Kapitel 4.2.), zeigt die statistische Auswertung unter Einbeziehung der Intensität der QC-Immunreaktivität einen signifikanten ( $p < 0.05$ ) Unterschied zwischen Alzheimer- und Kontrollgehirnen. Durchschnittlich zeigen 40 ( $\pm 40$  SD) Neurone pro  $\text{mm}^2$  eine starke und 179 ( $\pm 72$  SD) Neurone pro  $\text{mm}^2$  eine schwache QC-Immunreaktivität in den Gehirnen von Kontrollen ( $n=6$ ) sowie 80 ( $\pm 12$  SD) Neurone pro  $\text{mm}^2$  eine starke und 140 ( $\pm 45$  SD) Neurone pro  $\text{mm}^2$  eine schwache QC-Immunreaktivität in den Gehirnen von Alzheimerpatienten ( $n=5$ ) (Abb. 13C). Damit wurde in der Schicht II des entorhinalen Kortex im Vergleich mit allen anderen untersuchten Neuronenpopulationen mit Abstand am häufigsten eine starke QC-Immunreaktivität gefunden. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass im entorhinalen Kortex von Patienten mit AD im Vergleich zum entorhinalen Kortex in Kontrollgehirnen statistisch nicht mehr Neurone QC-immunreaktiv sind, diese aber signifikant häufiger eine stärkere Färbeintensität aufweisen, was Rückschlüsse auf eine erhöhte Expression des Enzyms erlaubt.



**Abbildung 13:** Auch im entorhinalen Kortex (Area 28 nach Brodmann) ist die Anzahl stark-QC-gefärbter Neurone in Gehirnen von Alzheimerpatienten signifikant gegenüber der in Kontrollgehirnen erhöht (C). In der Schicht der Inselneurone (Lamina II) zeigen besonders viele Neurone eine starke QC-Immunreaktivität (A und B). (\*  $p < 0,05$ ) Maßstabsbalken 200  $\mu\text{m}$



### 3.4. Schichtspezifische Verteilung der QC-Immunreaktivität im temporalen und entorhinalen Kortex in Alzheimer- und Kontrollgehirnen

Die Untersuchung und Auswertung des temporalen und entorhinalen Kortex fand in den vorhergehenden Kapiteln vor allen Dingen unter zwei Gesichtspunkten statt, der Anzahl QC-positiver Neurone und der Stärke der QC-Immunreaktivität. Die erhobenen Werte beziehen sich dabei jeweils auf die im Durchschnitt über alle Kortexschichten hinweg gefundenen Neurone. Die Zytoarchitektur dieser Hirnregionen mit ihrer Schichtung (*Laminae*) ist aber nicht nur aus morphologischen Gesichtspunkten interessant. Die Verbindungen, welche Neurone in den jeweiligen Kortexschichten mit anderen Gehirnregionen verbinden, sind spezifisch und für funktionelle Betrachtungsweisen entscheidend. Aus diesem Grund ist es sinnvoll, Alzheimer- und Kontrollgruppen auch auf der Ebene dieser Kortexschichten unter den beiden genannten Gesichtspunkten zu vergleichen (Abb. 14). Dabei zeigt sich, dass im temporalen Kortex der Anteil QC-positiver Neurone an der Gesamtneuronenzahl in jeder Kortexschicht in den Gehirnen von Alzheimerpatienten signifikant höher ist als in Kontrollgehirnen. Darüber hinaus fällt auf, dass der Kurvenverlauf, welcher die laminare Verteilung der QC-positiven Neurone im temporalen Kortex von Kontrollgehirnen darstellt, in seiner Form auch die Verteilung der QC-Neurone in der entsprechenden Hirnregion von Alzheimerpatienten beschreibt (Abb. 14A). Das Kurvenprofil erfährt bei dieser Darstellung der schichtspezifischen Verteilung von QC eine Verschiebung für die Gruppe der Alzheimergehirne in Richtung eines erhöhten Anteils von QC-positiven Neuronen an der Gesamtmenge. Dieser Kurvenverlauf zeigt auch, dass in beiden untersuchten Gruppen in den Pyramidenzellschichten III und V des temporalen Kortex der Anteil an QC-positiven Neuronen, verglichen mit den anderen Kortexschichten, am größten ist. Zudem sind es auch diese beiden Kortexschichten, in denen der prozentuale Anteil stark-QC-positiver Neurone in den Gehirnen von Alzheimerpatienten signifikant höher liegt als bei Kontrollgehirnen (Abb. 14C).

Im entorhinalen Kortex findet sich in keiner der untersuchten Kortexschichten ein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Anteil QC-positiver Neurone zwischen Alzheimer- und Kontrollgehirnen (Abb. 14B). Die QC-Immunreaktivität dieser in Inseln formierten Neuronengruppen ist so prominent, dass sie in vielen Präparaten

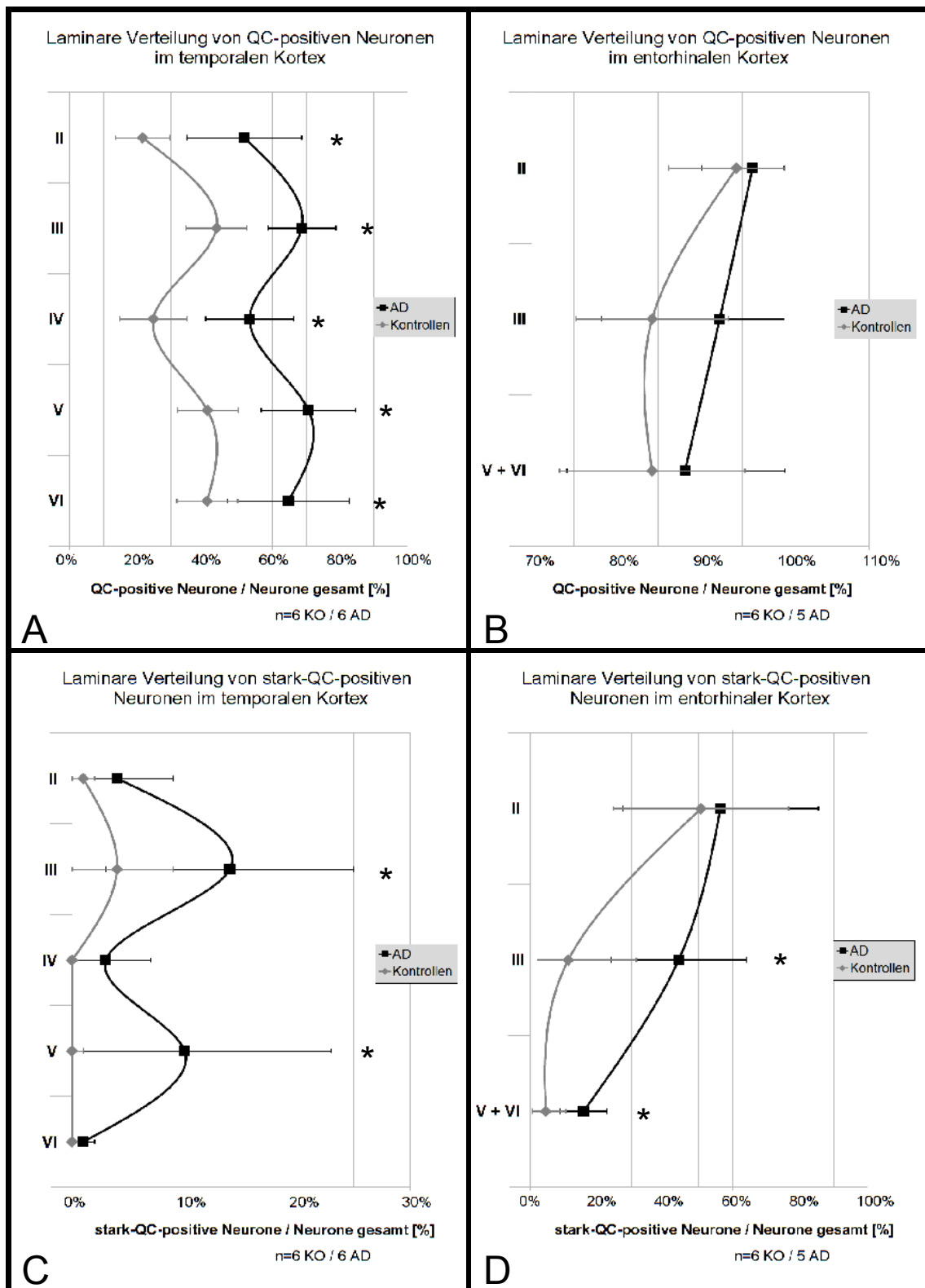
bereits makroskopisch zu erkennen sind. In beiden Gruppen sind über 90% der Neurone in Kortexschicht II QC-positiv, wovon wiederum mehr als die Hälfte eine starke QC-Immunreaktivität zeigen. Diese Neurone vermitteln über den *Tractus perforans* eine der Hauptafferenzen des Hippocampus und erhalten Projektionen aus dem postrhinalen und perirhinalen Kortex. Da die QC-Immunreaktivität dieser Inselneurone sowohl in Gehirnen der Alzheimer- als auch der Kontrollgruppe sehr ausgeprägt ist, lässt sich kein signifikanter Unterschied für die in der entorhinalen Schicht II angeordneten Neurone zeigen (Abb. 14B und D). In den Kortexschichten III und V+VI hingegen ist der Anteil der Neurone, die eine starke QC-Immunreaktivität zeigen, in den Gehirnen von Alzheimerpatienten signifikant höher ( $p < 0,05$ ) (Abb. 14D). Neurone der entorhinalen Schicht III erhalten Fasern aus perirhinalen Kortexarealen, projizieren in das *Stratum lacunosum moleculare* auf Pyramidenzellen des Ammonshorns und bilden eine zweite direkte Afferenz des Hippocampus. Es entsteht der Eindruck, dass in der Kortexschicht III stark-QC-positive Neurone vermehrt oberhalb der *Lamina dissecans* am Übergang zur Kortexschicht V+VI liegen (siehe Abb. 9A und B).

Neurone in den entorhinalen Schichten V und VI erreichen nach intrahippocampaler Verschaltung Afferenzen aus dem Subikulum. Efferenzen dieser entorhinalen Schichten ziehen in Areale des Assoziationskortex wie den präfrontalen Kortex und in Gebiete des inferioren temporalen Kortex. Die Zahlenwerte für die in diesem Kapitel beschriebenen Beobachtungen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3 Laminare Verteilung von QC-positiven und stark-QC-positiven Neuronen

	Kontrollen		AD	
	QC-positive Neurone [%]	stark-QC-positive Neurone [%]	QC-positive Neurone [%]	stark-QC-positive Neurone [%]
temporaler Kortex				
II	21,6 (± 8,0)	1,0 (± 8,0)	51,6 (± 17,2)*	4,0 (± 5,3)
III	43,5 (± 9,1)	4,1 (± 8,0)	68,6 (± 9,8)*	14,3 (± 10,9)*
IV	24,8 (± 9,5)	0,0 (± 0,0)	51,3 (± 12,4)*	2,8 (± 3,9)
V	40,8 (± 9,3)	0,3 (± 0,5)	70,6 (± 14,5)*	10,1 (± 13,0)*
VI	40,7 (± 8,6)	0,0 (± 0,0)	64,6 (± 18,4)*	1,0 (± 1,1)
entorhinaler Kortex				
II	94,3 (± 7,8)	50,6 (± 25,9)	96,2 (± 6,1)	56,4 (± 28,7)
III	84,3 (± 9,2)	11,3 (± 24,3)	93,2 (± 13,6)	44,0 (± 20,3)*
V+VI	84,3 (± 11,5)	4,6 (± 10,0)	88,2 (± 13,7)	15,8 (± 6,6)*

\* signifikant gegenüber Kontrollen ( $p < 0,05$ )

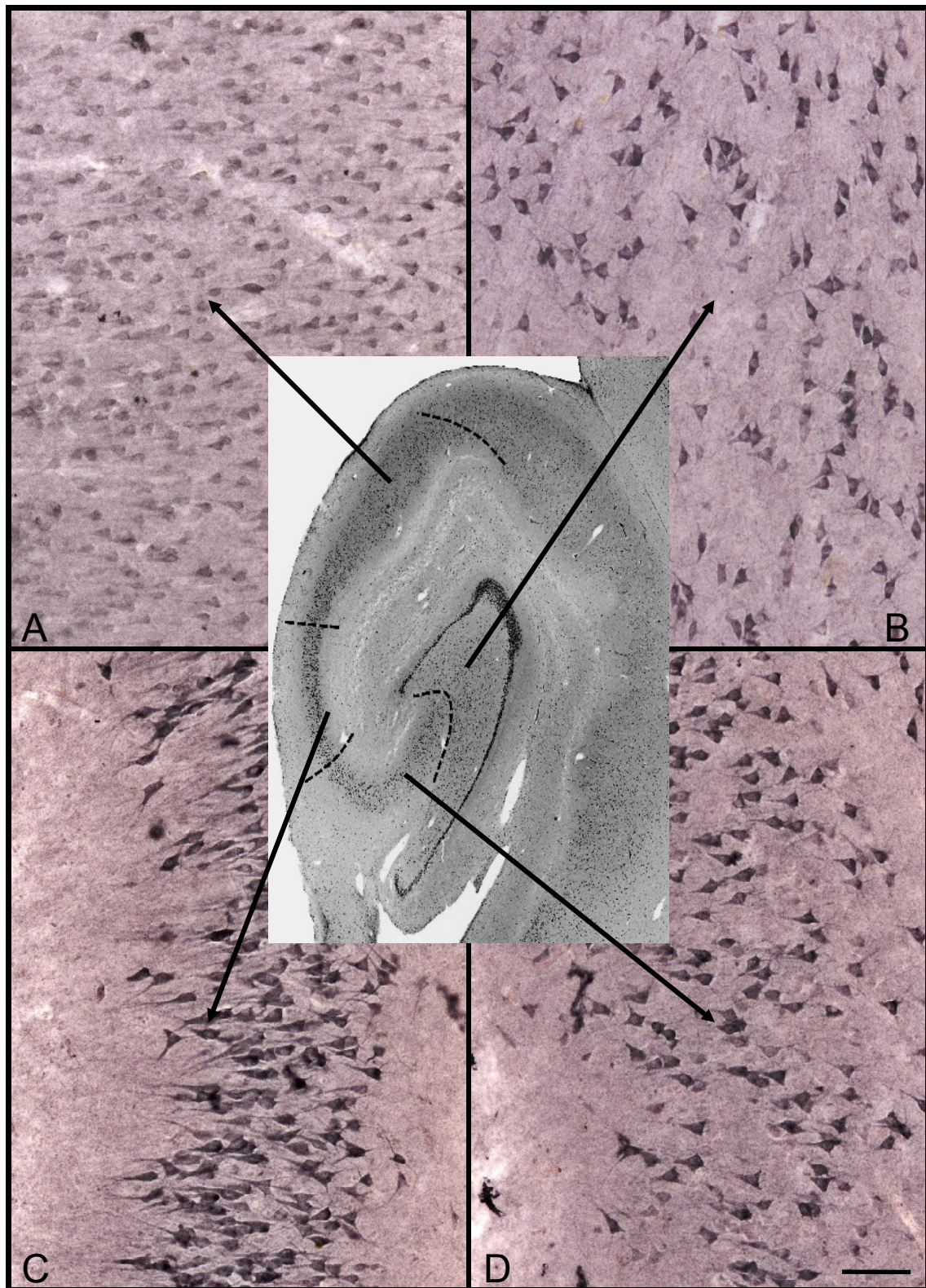


**Abbildung 14:** Anteil QC-positiver und stark-QC-positiver Neuronen über die untersuchten Kortexschichten im temporalen Kortex (Area 22 nach Brodmann) (A, C), und entorhinalen Kortex (B, D). Im temporalen Kortex findet sich für alle Zellschichten ein signifikant höherer Anteil QC-positiver Neurone in Alzheimergehirnen im Vergleich zu Kontrollgehirnen (\*  $p < 0,05$ ).

### 3.5. QC-Immunreaktivität der Ammonshornregionen CA1 – CA4

Entsprechend der von Lorente de No 1934 eingeführten Systematik wurde das Ammonshorn in vier Regionen unterteilt (CA1 - CA4), von denen nur die CA1 Region ausgewertet wurde. Der gewundene Verlauf des Hippocampus, der zum Vergleich mit dem namensgebenden „Seepferdchen“ führte, bedingt, dass abhängig von Schnittebene und Schnitthöhe nicht alle vier Regionen angeschnitten vorlagen und einer statistischen Auswertung zugänglich waren. Auf Grund dessen war eine statistische Auswertung, wie sie für die CA1 Region angefertigt wurde, für die Ammonshornregionen CA2 - CA4 nicht möglich. In den Gehirnen von Kontrollen und Alzheimerpatienten von denen Präparate angefertigt werden konnten, die alle vier Ammonshornregionen beinhalten, zeigte sich jedoch ein charakteristischer Verlauf der QC-Immunreaktivität. Dabei scheint die Stärke der QC-Immunreaktivität in der CA1 Region moderat, in der CA4 moderat bis stark, in der CA3 Region stark und schließlich in der CA2 Region am stärksten ausgeprägt zu sein (Abb. 15).

Dieses Verteilungsmuster ( $CA1 < CA4 < CA3 < CA2$ ) fand sich bei 2 der 3 untersuchten Gehirne aus der Gruppe der Alzheimerpatienten und bei 4 der 5 untersuchten Gehirne der Kontrollgruppe. In den beiden übrigen Hippocampi waren Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Ammonshornregionen nicht klar abgrenzbar, dem beschriebenen Verteilungsmuster aber nicht entgegengesetzt.



**Abbildung 15:** In den Gebieten des Ammonshorns (CA1 bis CA4) findet sich sowohl bei Alzheimer- als auch bei Kontrollfällen eine Zunahme der Intensität der immunhistochemischen Färbung gegen QC in der Reihenfolge:

CA1 (A.) < CA4 (B.) < CA3 (D.) < CA2 (C.)

bei insgesamt 6 von 8 untersuchten Gehirnen. *Maßstabsbalken* 200 µm



## 4. Diskussion

### 4.1. Abeta-Spezies und QC in der AD

Intra- und extrazelluläre Abeta-Ablagerungen sind ein neuropathologisches Hauptmerkmal der AD (Braak und Braak, 1991; Esiri, 2001; zur Übersicht siehe Castellani *et al.*, 2010). Die Amyloid-Kaskaden-Theorie sieht die Bildung neurotoxischer Abeta-Spezies als zentrales Ereignis in der Entstehung dieser Demenz, in dessen Folge es in betroffenen Hirnarealen zur Akkumulation von hyperphosphoryliertem Tau, zu Entzündung, Gliose und letztlich zu neuronalem Zelluntergang kommt (Hardy und Higgins, 1992; Hardy und Selkoe, 2002; Wirths *et al.*, 2004). In der Tat belegen Mutationen, die zu familiären Formen der AD führen und in einer Vielzahl von transgenen Mausmodellen exprimiert werden, dass eine modifizierte APP-Struktur oder Prozessierung ausreicht, um eine frühe Krankheitsentstehung hervorzurufen (Russo *et al.*, 2000; Selkoe, 2001; zur Übersicht siehe Turner, 2006). Darüber hinaus wird auch das durch die ApolipoproteinE-Isoform  $\epsilon 4$  erhöhte Risiko, an AD zu erkranken auf die Interaktion von Apolipoproteinen und Abeta zurückgeführt (Munson *et al.*, 2000; Holtzman, 2004). Allerdings korreliert die Menge der extrazellulären Abeta-Ablagerungen schlecht mit dem Grad des Nervenzellverlustes und der kognitiven Dysfunktion im Verlauf der AD und gab Anlass, die Rolle von Abeta genauer zu untersuchen (Braak und Braak, 1991; Hardy und Higgins, 2002; Goedert *et al.*, 2006; Arendt, 2009).

Neuere Studien zeigen, dass nicht vorrangig Abeta-Plaques, sondern intrazellulär gebildete Abeta-Oligomere für die Schädigung von Synapsen und Nervenzellen verantwortlich sind (McLean *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2004; zur Übersicht siehe Walsh und Selkoe 2007). Dabei korreliert die Menge an Abeta-Oligomeren gut mit der Schwere der kognitiven Dysfunktion und Neurodegeneration (McLean *et al.*, 1999; Näslund *et al.*, 2000). Die Tendenz von Abeta-Peptiden stabile  $\beta$ -Faltblattstrukturen und Oligomere zu bilden, sich dem proteolytischen Abbau zu entziehen und die Anlagerung anderer Peptide zu fördern sowie ihr neurotoxisches Potenzial hängt dabei maßgeblich von ihrer N-terminalen Struktur ab (Saido *et al.*, 1995; He und Barrow, 1999; Russo *et al.*, 2002; Schilling, 2004; Schilling *et al.*, 2006; Schlenzig *et al.*, 2009). Bemerkenswerterweise machen Abeta-Peptide, die an ihrem N-Terminus einen Pyroglutamyl-Laktamring aufweisen, besonders in den frühen Stadien der AD einen

Hauptbestandteil der Abeta-Last aus. Sie aggregieren bis zu 250x schneller als unmodifiziertes Abeta (1-40/42), sind gegen Proteolyse geschützt und wirken als Aggregationskeim für andere Abeta-Spezies (Saido *et al.*, 1995; Harigaya *et al.*, 2000; Piccini *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Schilling *et al.*, 2006; McColl *et al.*, 2009). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass pE-Abeta-Oligomere nur langsam Fibrillen bilden und die Organisation anderer Abeta-Spezies zu höheren Organisationsformen mit verminderter Pathogenität sogar hemmen (D'Arrigo *et al.*, 2009; Wirths *et al.*, 2010a).

Das Enzym QC katalysiert die Zyklisierung von Abeta zu pE-Abeta *in vitro* und *in vivo* und wird in Neuronenpopulationen gefunden, in denen es im Rahmen der AD früh zum Verlust von Neuronen kommt (Schilling *et al.*, 2008a; Morawski *et al.*, 2010; Hartlage-Rübsame *et al.*, 2011). Es war deshalb Ziel dieser Arbeit, die Verteilung von QC im temporalen Kortex sowie in der Hippocampusformation zu untersuchen, um Projektionswege und gefährdete Neuronenpopulationen zu identifizieren und auf mögliche Unterschiede zwischen Gehirnen von Alzheimerpatienten und Kontrollen hinzuweisen.

## 4.2. QC im temporalen Kortex

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die neuronale Verteilung des Enzyms QC im temporalen Kortex (Area 22 nach Brodmann), im Hippocampus sowie im angrenzenden entorhinalen Kortex des Menschen in den Gehirnen von Alzheimerpatienten und Kontrollen, systematisch dargestellt. Dabei zeigen im temporalen Kortex von Alzheimerpatienten mit 61,7% aller Neurone doppelt so viele Neurone eine QC-Immunreaktivität als dies in Kontrollgehirnen der Fall ist (Kapitel 3.2.1 sowie Abb. 8). Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Schilling und Kollegen, die 2008 in dieser Hirnregion mittels quantitativer PCR und Western Blot Untersuchungen signifikant erhöhte mRNA- und Proteinkonzentrationen der QC nachweisen konnten (Schilling *et al.*, 2008a). Für den temporalen Kortex wurde in den hier durchgeführten Untersuchungen weiterhin gezeigt, dass insbesondere große Pyramidenneurone in den Kortexschichten III und V signifikant häufiger eine QC-Immunreaktivität oder starke QC-Immunreaktivität zeigen (Kapitel 3.3.1. sowie Abb. 12, 14A und C). Dieser Befund korreliert mit einer Reihe von

Untersuchungen, in denen der stärkste Verlust von Synapsen und die höchste Dichte an Neurofibrillenbündeln und senilen Plaques in den Gehirnen von Alzheimerpatienten und in AD-Mausmodellen in diesen Kortexschichten III und V, mit deutlicher Betonung der Kortexschicht III, gefunden wurde (Hof *et al.*, 1990; Scheff *et al.*, 1993; Jawhar *et al.*, 2012). Ferner werden Neurone als besonders gefährdet angesehen, die wie jene der Schicht III ipsilaterale kortiko-kortikale Verbindungen herstellen, wenngleich hier die Bildung von Neurofibrillenbündeln als ursächlich diskutiert wurde (Braak *et al.*, 1999). Es gibt überdies Literaturdaten, die zeigen, dass es in Neuronen des temporalen Kortex zu einer Reihe von Dysregulationen in Genen kommt, die, wie beispielsweise BACE-1, mit der Prozessierung von Abeta-Peptiden assoziiert sind (Yang *et al.*, 2003; Haass, 2004; Rossner *et al.*, 2006; Haroutunian *et al.*, 2008; Horesh *et al.*, 2011). Ferner zeigen Neurone, die nah an senilen Plaques lokalisiert sind, morphologische und molekulare Veränderungen (Koffie *et al.*, 2009). Es ist vorstellbar, dass es in Folge einer Überexpression von QC in Neuronen des temporalen Kortex zu einer pE-Abeta vermittelten Zellschädigung kommt. Übereinstimmend wurden pE-Abeta-Plaques im temporalen Kortex vorwiegend in QC-reichen Kortexschichten in enger Nachbarschaft zu QC-positiven Neuronen detektiert (Abb. 3C), was weitestgehend der Plaqueverteilung, wie sie von anderen Gruppen beschrieben wurde, entspricht (Braak und Braak, 1991).

Obwohl die Bildung von Abeta-Oligomeren vorwiegend intrazellulär stattfindet (Takahashi *et al.*, 2004; zur Übersicht siehe Walsh und Selkoe, 2007), wird vermutet, dass Abeta-Plaques, als Pool für neurotoxische Abeta-Oligomere fungieren können und diese in die nähere Umgebung abgeben (McLean *et al.*, 1999; Koffie *et al.*, 2009).

Die schichtspezifische Verteilung von QC-positiven Neuronen im temporalen Kortex findet sich in den Gehirnen von Alzheimerpatienten - im Sinne eines erhöhten Anteils QC-positiver Neurone - auf einem höheren Niveau wieder als dies in Kontrollgehirnen der Fall ist (Abb. 14A). Dies lässt vermuten, dass die QC-Expression nicht nur in einzelnen Neuronen, sondern vielmehr in allen Kortexschichten eines größeren Areals moduliert wird.

Da zum Spektrum der QC-Substrate auch Chemokine wie jene aus der MCP-Familie gehören, die zur Chemotaxis von Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten führen, ergeben sich Hinweise auf eine Funktion der QC bei inflammatorischen Prozessen, wie



sie eindeutig für Isoenzyme der QC nachgewiesen wurde (Cynis, 2009, Cynis *et al.*, 2011). Dabei deutet die Rolle der QC in verschiedenen Effektorsystemen bereits an, dass QC-Inhibitoren die Krankheitsentstehung auf unterschiedlichen Ebenen modulieren könnten. Allerdings müssen künftige Untersuchungen im Detail klären, in welchem Zusammenhang QC mit Neuroinflammation steht, und welche Faktoren die QC-Expression beeinflussen.

Dabei ist zu beachten, dass gravierende Unterschiede in Bezug auf die Expression von QC im Tiermodell und im Menschen bestehen. Während im Kortex von Wildtyp C57BL/6 Mäusen weniger als 1% aller Neurone eine deutliche QC-Immunreaktivität zeigen, liegt der Anteil QC-positiver Neurone in den Gehirnen von Kontrollen bei über 30%. Darüber hinaus wird QC in Mäusen hauptsächlich in Interneuronen detektiert, die über alle Kortexschichten verteilt scheinen (Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2009), während, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, im humanen Kortex QC vorwiegend von großen Pyramidenneuronen mit Betonung der Kortexschicht III exprimiert wird (Abb. 8).

Deutliche Unterschiede in der QC-Expression zwischen Mäusen und Menschen wurden auch in subkortikalen Hirngebieten wie dem nLC, dem NbM und dem Edinger-Westphal-Kern sowie in der Hippocampusformation beschrieben (Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2009; Morawski *et al.*, 2010; Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2011).

### 4.3. QC im entorhinalen Kortex

Der entorhinale Kortex ist im Verlauf der AD als eine der ersten Hirnregionen von typischen Veränderungen betroffen. Aus diesem Grund bieten Untersuchungen dieser Hirnregion einen Ansatzpunkt, mögliche Charakteristika, die der Vulnerabilität dieser Neurone zu Grunde liegen, zu ergründen und kausale Zusammenhänge des Fortschreitens der Erkrankung zu identifizieren. In dieser Hinsicht ist es besonders interessant, dass eine QC-Expression in der Kortexschicht II, einer Neuronenpopulation, die einen massiven Zellverlust in der frühen Phase dieser Erkrankung verzeichnet (Braak und Braak; 1992; Gómez-Isla *et al.*, 1996), sowohl in den Gehirnen der Alzheimer- als auch der Kontrollgruppe in über 90% der Neurone detektiert wird (Cdb. 13A und B, 14B und D).

Man geht davon aus, dass die selektive Vulnerabilität von Neuronen der Kortexschicht II multifaktoriell bedingt und auf funktionelle, molekulare und ontogenetische

Besonderheiten dieser Neurone zurückzuführen ist (zur Übersicht siehe Stranahan und Mattson, 2010).

Dass die Bildung von pE-Abeta durchaus eine Rolle für die Vulnerabilität von Neuronen des entorhinalen Kortex spielen könnte, zeigen der Nachweis von pE-Abeta-Plaques im entorhinalen Kortex der Maus (Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2011) und des Menschen (nicht dargestellt) sowie Untersuchungen entlang seiner Projektionen in die Hippocampusformation.

Der entorhinale Kortex ist, trotz seiner geringen Ausdehnung, eine wichtige Ursprungsregion für Afferenzen in den Hippocampus. So projizieren Neurone der entorhinalen Schicht II in das *Stratum moleculare* des *Gyrus dentatus* und die CA3 Region des Ammonshorns, während Neurone der entorhinalen Schicht III im *Stratum lacunosum moleculare* mit Pyramidenzellen der CA1 Region des Ammonshorns und dem Subikulum verschaltet sind (Andersen, 2007). Im Mausmodell und in humanem Gewebe kommt es interessanterweise bevorzugt in diesen Schichten zu diffusen pE-Abeta- und Abeta-Ablagerungen (Crain und Burger, 1988; Braak und Braak, 1991; Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2011), wobei für letztere eine deutliche Reduktion nach Ablation des entorhinalen Kortex oder des *Tractus perforans* beschrieben wurde (Lazarov *et al.*, 2002; van Groen *et al.*, 2003). Einige Autoren schlussfolgern, dass QC und/oder pE-Abeta anterograd in den Axonen der Projektionsneurone transportiert und über die Synapsen im Hippocampus sezerniert werden (Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2011). Da pE-Abeta häufig im Kern von Abeta-Plaques gefunden wird, wird vermutet, dass dieses anschließend als Aggregationskeim die Anlagerung weiterer Abeta-Spezies initiiert, wie es in anderen Studien *in vitro* gezeigt wurde (Schilling *et al.*, 2006; Schlenzig *et al.*, 2009; McColl *et al.*, 2009). Allerdings wird ferner auch die Möglichkeit diskutiert, dass Efferenzen aus dem ebenfalls QC-positiven nLC an der Freisetzung von QC und/oder pE-Abeta beteiligt sein könnten (Muresan und Muresan, 2008; Morawski *et al.*, 2010; Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2011).

Obwohl ein physiologisches Substrat der QC im Hippocampus noch nicht identifiziert werden konnte, gibt es Hinweise darauf, dass TRH wie in anderen Hirnarealen im Hippocampus als Substrat der QC eine Rolle spielt. TRH zeigt *in vitro* neuroprotektive Effekte, indem es Apoptosen und den Verlust von Synapsen verhindert. Entsprechend der Projektionen in den Hippocampus werden wie für pE-Abeta die höchsten TRH

Konzentrationen im *Gyrus dentatus* und den Ammonshornregionen CA1 und CA3 gefunden (Low *et al.*, 1989; Luo *et al.*, 2002).

Für die Bildung und Verbreitung von Abeta-Peptiden lassen diese Hinweise vermuten, dass nicht allein Neurone in QC-reichen Hirnregionen gefährdet sind durch pE-Abeta geschädigt zu werden, sondern auch Zellen in Hirnregionen, die Afferenzen von diesen Neuronenpopulationen erhalten.

Insgesamt ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gehirnen von Alzheimerpatienten und Kontrollen hinsichtlich des Anteils QC-positiver Neurone im entorhinalen Kortex zeigen. Signifikante Unterschiede zeigen sich jedoch unter Berücksichtigung der Intensität der QC-Immunreaktivität für die tieferen entorhinalen Schichten III und V+VI. Angesichts der Ergebnisse im temporalen Kortex und des sich abzeichnenden Trends in dieser Hirnregion (Kapitel 3.3.1. sowie Abb. 14B und D), ist eine Signifikanz hinsichtlich des Anteils QC-positiver Neurone bei einer hohen Fallzahl zu erwarten. Dieses sollte unter Einbeziehung einer höheren Fallzahl und weiterer Methoden in künftigen Studien untersucht werden.

Die schichtspezifische Verteilung der QC-Immunreaktivität konnte indes herausgestellt werden und zeigt, dass insbesondere in Neuronen der entorhinalen Schichten II und III eine auffällig starke QC-Immunreaktivität vorliegt (Abb. 9). Damit wird QC vorwiegend in den entorhinalen Schichten nachgewiesen, die in den Hippocampus projizieren. Es ist jedoch weiterhin unklar, weshalb es zur Ablagerung pE-Abeta- und Abeta in Form von Plaques in der entorhinalen Schicht III, nicht aber in der Schicht II kommt (Braak und Braak, 1991). Eine mögliche Erklärung könnten ungleiche Ausprägungen des Katabolismus von Abeta-Peptiden liefern. So konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen von Neprilysin und der Pyroglutamylaminopeptidase, Enzyme die maßgeblich mit dem Abbau von pE-Abeta- und Abeta-Peptiden in Verbindung gebracht werden, in den Gehirnen von Patienten mit AD allgemein erniedrigt sind und im temporalen Kortex sowie im Hippocampus die niedrigsten Konzentrationen erreichen (Saido, 1998; Yasojima *et al.*, 2001). Darüber hinaus zeigten Marcello und Kollegen, dass die Konzentration von Antikörpern, die gegen pE-Abeta gerichtet sind, im Plasma von Alzheimerpatienten signifikant erniedrigt ist (Marcello *et al.*, 2011). Ferner wurde in der vorliegenden Arbeit Mikroglia, die eine Schlüsselrolle beim Abbau von Abeta-Peptiden einnimmt und deren Aktivität vielfältig moduliert wird (Streit, 2004; Cynis, 2009), vermehrt in den oberflächlichen entorhinalen Schichten gefunden

(nicht dargestellt). Es ist denkbar, dass das Vermögen pE-Abeta bzw. Abeta abzubauen auch innerhalb eines Hirnareals variiert und diese Peptide, obwohl sie von Neuronen der entorhinalen Schichten II und III gebildet werden und diese lokal schädigen, nur in den tiefen Schichten nachweisbar akkumulieren. Entsprechend der Fragestellung dieser Arbeit bestätigt sich, wie bereits für den temporalen Kortex beschrieben, die These, wonach QC verstärkt in Neuronenpopulationen gefunden wird, die frühzeitig im Verlauf der AD geschädigt werden.

#### 4.4. QC im Hippocampus

Es ist allgemein anerkannt, dass dem Hippocampus als Teil des limbischen Systems eine zentrale Rolle für Lernvorgänge und die Bildung von deklarativen Gedächtnisinhalten zukommt. Insbesondere der Verlust von Synapsen und Neuronen in der Ammonshornregion CA1 und im Subikulum gilt als potentieller Verlaufsmarker für die AD (West *et al.*, 1994; Simic *et al.*, 1997; von Gunten *et al.*, 2006; Castellani *et al.*, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Verteilung von QC in den Ammonshornregionen CA1 bis CA4 und im Subiculum dargestellt und der Anteil QC-positiver Neurone im Subikulum und der CA1 Region vergleichend in den Gehirnen von Patienten mit AD und Kontrollen untersucht und statistisch ausgewertet (Abb. 10, 11 und 15). Dabei wurde für quantitative Untersuchungen in den beiden letztgenannten Regionen in Folge einer homogenen Verteilung der QC-Immunreaktivität nicht zwischen QC-positiven und stark-QC-positiven Neuronen differenziert.

Wie im temporalen Kortex weicht die Verteilung von QC im Hippocampus des Menschen deutlich von jener im Hippocampus der Maus ab. Während im Hippocampus der Maus hauptsächlich Interneurone und nur vereinzelt Pyramidenzellen eine QC-Immunreaktivität zeigten (Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2009), wird QC im humanen Hippocampus in nahezu jedem Neuron detektiert (Abb. 15). Diese Beobachtung zeigt zum einen wie wichtig Untersuchungen an humanem Gewebe sind und bestätigt zum anderen den von Morawski und Kollegen berichteten Befund, dass die QC-Immunreaktivität auch in subkortikalen Hirngebieten des Menschen stärker ausgeprägt ist als in Mäusen (Morawski *et al.*, 2010). Insgesamt konnte, bei über 80% (CA1) bzw. 90% (Subikulum) QC-positiver Neurone in den Gehirnen von Alzheimerpatienten und Kontrollen, nur für die CA1 Region des Ammonshorns eine signifikant erhöhte Anzahl

QC-positiver Neurone in den Gehirnen von Alzheimerpatienten gezeigt werden (Kapitel 3.2.3. sowie Abb. 10, 11).

Im Hinblick auf den QC-Gehalt sollten bei über 80% QC-positiven Neuronen und in Anlehnung an vorhergehende Überlegungen für alle Ammonshornregionen und das angrenzende Subikulum weiterführende Untersuchungen mittels quantitativer PCR und und Protein-biochemischen Methoden durchgeführt werden.

Besonders interessant ist weiterhin das Verteilungsmuster der QC-Immunreaktivität  $CA1 < CA4 < CA3 < CA2$  in den Gehirnen von Patienten mit AD und Kontrollgehirnen (Kapitel 3.5. sowie Abb. 15).

Dieses Verteilungsmuster war überraschend und findet sich so weder in Bezug auf den für die AD typischen Zelluntergang noch für das Auftreten von Abeta-Plaques wieder (Braak und Braak, 1991; West *et al.*, 1994; Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2011).

Sollte QC, wie in Kapitel 4.2. beschrieben, über entorhinale Afferenzen in den Hippocampus transportiert werden, könnte eine Erklärung für das gefundene Verteilungsmuster der QC-Immunreaktivität im Zusammenhang mit der externen Zufuhr von QC stehen. Um diese These zu überprüfen wird es notwendig sein, die Regulation der QC-Expression zukünftig genauer zu beleuchten. Ein Hinweis auf eine extrazellulär erhöhte Konzentration von QC könnte die im Vergleich zu den anderen untersuchten Hirnregionen erhöhte Hintergrundfärbung in Präparaten des Hippocampus liefern (Abb. 15). Welche Bedeutung extrazelluläre Mengen von QC für die Umsetzung von Neuropeptiden und Abeta im Hippocampus haben, ist jedoch weiter unklar. Obwohl das intraneuronale Milieu in intrazellulären Kompartimenten die Bildung von pE-Abeta begünstigt (Takahashi *et al.*, 2004; Walsh und Selkoe, 2007; Koffie *et al.*, 2009), zeigen Zellkultur-Versuche und Mausmodelle, dass Abeta auch extrazellulär zu pE-Abeta umgesetzt wird (Cynis *et al.*, 2006; Cynis *et al.*, 2008; Schilling *et al.*, 2008b). Von Neuronen der Ammonshornregionen CA2 und CA3 sind bislang keine Projektionen in den Neokortex bekannt, allerdings sind diese Neurone innerhalb der Hippocampusformation verschaltet und projizieren in subkortikale Areale (Andersen, 2007). Zu den Gründen, welche zu einer starken Expression der QC in den Gehirnen von Kontrollen und Alzheimerpatienten führen, könnte folglich auch ein hoher Bedarf des Hippocampus an Neuropeptiden beitragen, die wie TRH eine pE-Modifikation aufweisen. Der Verlust von Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex könnte, trotz des erhöhten QC-Gehaltes im Hippocampus, mit zur Abnahme der Konzentration von TRH

führen, wie sie für den Verlauf der AD beschrieben wurde (Low *et al.*, 1989; Luo *et al.*, 2002).

Untersuchungen in humanem Gewebe, bei denen pE-Abeta-Oligomere mit spezifischen Antikörpern in Neuronen und Blutgefäßwänden des Hippocampus nachgewiesen wurden (Wirths *et al.*, 2010a), heben die Rolle von Abeta-Oligomeren im Rahmen der modifizierten Amyloid-Kaskaden-Theorie als wahrscheinlichen Mechanismus auch für die Pathogenese des Hippocampus hervor (Hardy und Selkoe, 2002; Wirths *et al.*, 2004). Auch in den Hippocampi der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gehirne von Patienten mit AD wurde pE-Abeta intrazellulär detektiert (nicht dargestellt).

#### 4.5. Regionale, schichtspezifische und neuronale Verteilung von QC

Im Kontext der bislang über QC erschienen Publikationen und der hier vorgestellten Ergebnisse zeigt sich, dass QC in einer Vielzahl von subkortikalen aber auch neokortikalen Strukturen, wie der Hypophyse, dem Hypothalamus, dem Nucleus Edinger-Westphal, dem nLC, dem NbM, dem Striatum und dem Hippocampus sowie im entorhinalen und temporalen Kortex, stark exprimiert wird (Busby *et al.*, 1987; Fischer und Spiess, 1987; Pohl *et al.*, 1991; Morawski *et al.*, 2010; Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2011). Des weiteren liefern diese Arbeit und die Ergebnisse von Schilling und Kollegen deutliche Hinweise darauf, dass die Konzentrationen von QC in Neuronen von Patienten, die an AD erkrankten, auf Grund einer verstärkten Expression erhöht sind (Abb. 8, 11 und 14; Schilling *et al.*, 2008a). Obwohl die Vergleichbarkeit von Ergebnissen zur QC, die in humanem und murinem Gewebe gewonnen wurden, an Grenzen stößt (siehe Kapitel 4.2.), ist zu betonen, dass *in vivo* Experimente gezeigt haben, dass im Altersgang der Maus der Gehalt an QC im Kortex und Hippocampus abnimmt (Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2009). Da die Personen aus der Gruppe der kognitiv Gesunden zum Zeitpunkt ihres Todes im Durchschnitt jünger waren als es für die Gruppe der Alzheimerpatienten der Fall war, ist für zukünftige Untersuchungen denkbar, dass die beschriebenen Effekte noch drastischer ausfallen können.

Die schichtspezifische Verteilung von QC machte besonders im temporalen und entorhinalen Kortex deutlich, dass in erster Linie jene Neuronenpopulationen eine starke QC-Immunreaktivität zeigen, für die eine ausgeprägte Vulnerabilität im

Zusammenhang mit der AD beschrieben ist (siehe Kapitel 4.2. und 4.3.; Braak und Braak, 1992; Scheff und Douglas, 1993; Gómez-Isla *et al.*, 1996; Stranahan und Mattson, 2010). Die breite Streuung der Anzahl QC-positiver bzw. stark-QC-positiver Neurone steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen, wie sie auch von anderen Gruppen hinsichtlich gemessener Parameter gemacht wurde und bestätigt die These, wonach jedes Gehirn einmalig ist und nur eine Momentaufnahme im Verlauf der AD darstellt (Saido *et al.*, 1995; Simic *et al.*, 1997; Gandy, 2005). Gleichwohl war das Verteilungsmuster der gefärbten Neurone einheitlich.

Nachdem *in situ* ein räumlicher Bezug zwischen neuronaler QC-Expression und pE-Abeta, dem Produkt enzymatischer QC-Aktivität, hergestellt werden konnte (Morawski *et al.*, 2010; Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2011) und überzeugend dargestellt wurde, dass QC für die Bildung von pE-Abeta aus Abeta *in vitro* und *in vivo* verantwortlich ist (Schilling *et al.*, 2004, Schilling *et al.*, 2008a; Schilling *et al.*, 2008b), erhärtet sich der Verdacht, dass die (verstärkte) Expression von QC als Risikofaktor für neuronale Schädigung angesehen werden muss und eine entscheidende Rolle für die Pathogenese der AD spielt. Ferner unterstützen die vorgelegten Ergebnisse die These, dass QC bzw. pE-Abeta-Peptide über axonalen Transport in Zielgebiete gelangen und dort die neuronale Schädigung und Bildung von senilen Plaques initiieren können (Morawski *et al.*, 2010; Hartlage-Rübsamen *et al.*, 2011).

Wenngleich der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Verteilung und dem Anteil QC-positiver Neurone lag, wurde die gemessene Gesamtzahl aller Neurone in den untersuchten Hirngebieten ebenfalls statistisch ausgewertet und dargestellt (siehe Kapitel 3.1. sowie Abb. 7). Dass für die untersuchten Hirnregionen und insbesondere die für CA1 Region entgegen bestehender Darstellungen (Braak und Braak, 1991; West *et al.*, 1994, Simic *et al.*, 1997) keine signifikant verminderte Neuronendichte gefunden wurde, dürfte maßgeblich folgende Gründe haben:

Zum einen erfolgte auf Grund der Fragestellungen methodisch keine stereologische Zählung, sondern eine quantitative Auswertung, die anfälliger für Verzerrungen (Bias) ist, z.B. durch eine für die AD typische Gliose. Zum anderen stammen die verwendeten Gewebeschnitte aus allen anatomischen Abschnitten der Area 22 nach Brodmann sowie der Hippocampusformation, sodass immanente Unterschiede zwischen diesen Abschnitten, wie der rostro-caudalen Gradienten der Neuronendichten in der



Untersuchungen, in denen der stärkste Verlust von Synapsen und die höchste Dichte an Neurofibrillenbündeln und senilen Plaques in den Gehirnen von Alzheimerpatienten und in AD-Mausmodellen in diesen Kortexschichten III und V, mit deutlicher Betonung der Kortexschicht III, gefunden wurde (Hof *et al.*, 1990; Scheff *et al.*, 1993; Jawhar *et al.*, 2012). Ferner werden Neurone als besonders gefährdet angesehen, die wie jene der Schicht III ipsilaterale kortiko-kortikale Verbindungen herstellen, wenngleich hier die Bildung von Neurofibrillenbündeln als ursächlich diskutiert wurde (Braak *et al.*, 1999).

Es gibt überdies Literaturdaten, die zeigen, dass es in Neuronen des temporalen Kortex zu einer Reihe von Dysregulationen in Genen kommt, die, wie beispielsweise BACE-1, mit der Prozessierung von Abeta-Peptiden assoziiert sind (Yang *et al.*, 2003; Haass, 2004; Rossner *et al.*, 2006; Haroutunian *et al.*, 2008; Horesh *et al.*, 2011). Ferner zeigen Neurone, die nah an senilen Plaques lokalisiert sind, morphologische und molekulare Veränderungen (Koffie *et al.*, 2009). Es ist vorstellbar, dass es in Folge einer Überexpression von QC in Neuronen des temporalen Kortex zu einer pE-Abeta vermittelten Zellschädigung kommt. Übereinstimmend wurden pE-Abeta-Plaques im temporalen Kortex vorwiegend in QC-reichen Kortexschichten in enger Nachbarschaft zu QC-positiven Neuronen detektiert (Abb. 3C), was weitestgehend der Plaqueverteilung, wie sie von anderen Gruppen beschrieben wurde, entspricht (Braak und Braak, 1991).

Obwohl die Bildung von Abeta-Oligomeren vorwiegend intrazellulär stattfindet (Takahashi *et al.*, 2004; zur Übersicht siehe Walsh und Selkoe, 2007), wird vermutet, dass Abeta-Plaques, als Pool für neurotoxische Abeta-Oligomere fungieren können und diese in die nähere Umgebung abgeben (McLean *et al.*, 1999; Koffie *et al.*, 2009).

Die schichtspezifische Verteilung von QC-positiven Neuronen im temporalen Kortex findet sich in den Gehirnen von Alzheimerpatienten - im Sinne eines erhöhten Anteils QC-positiver Neurone - auf einem höheren Niveau wieder als dies in Kontrollgehirnen der Fall ist (Abb. 14A). Dies lässt vermuten, dass die QC-Expression nicht nur in einzelnen Neuronen, sondern vielmehr in allen Kortexschichten eines größeren Areals moduliert wird.

Da zum Spektrum der QC-Substrate auch Chemokine wie jene aus der MCP-Familie gehören, die zur Chemotaxis von Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten führen, ergeben sich Hinweise auf eine Funktion der QC bei inflammatorischen Prozessen, wie

Obwohl auch in den Gehirnen von kognitiv Gesunden große Mengen Abeta detektiert werden können, scheint die Akkumulation von pE-Abeta mit wenigen Ausnahmen auf Gehirne von Patienten mit AD beschränkt zu sein (Saido *et al.*, 1995; Harigaya *et al.*, 2000; Piccini *et al.*, 2005; Vanderstichele *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Wirths *et al.*, 2010b).

Dementsprechend stellen insbesondere die Prävention ihrer Bildung durch Blockade der QC oder die Entfernung durch Vakzination vielversprechende Therapieansätze dar (Sergeant *et al.*, 2003; Cynis *et al.*, 2006; Schilling *et al.*, 2008a/b, Wirths *et al.*, 2010a). In der Tat wurden in der jüngeren Vergangenheit Imidazolderivate als QC-Inhibitoren *in vitro* und *in vivo* getestet (Cynis *et al.*, 2006; Cynis *et al.*, 2008; Schilling *et al.*, 2008b) und führten zur Reduktion der pE-Abeta- und Gesamt-Abeta-Last sowie zu Verbesserungen der kognitiven Leistungsfähigkeit in transgenen Mausmodellen (Schilling *et al.*, 2008a).

Es dürfte als äußerst positiv bewertet werden, dass entgegen entsprechender Befürchtungen für den Einsatz von QC-Inhibitoren als Nebenwirkung nicht mit hormonellen Dysregulationen in Folge eines drastischen Abfalls essentieller Neuropeptide zu rechnen ist. Erstens deuten die Ergebnisse dieser Arbeit übereinstimmend mit den Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Schilling und Kollegen darauf hin, dass die Konzentration von QC in den Gehirnen von Alzheimerpatienten erhöht ist, was vermutlich zu einer gesteigerten Enzymaktivität führt, die durch QC-Inhibitoren normalisiert werden könnte (Schilling *et al.*, 2008a). Zweitens wird vermutet, dass die pE-Modifikation von Neuropeptiden, bei denen die N-terminale Zyklisierung von einem Glutaminrest ausgeht, in ausreichenden Mengen durch spontane Zyklisierung gebildet werden kann (Cynis *et al.*, 2006). Drittens gibt es deutliche Hinweise darauf, dass QC-Isoenzyme den Verlust der physiologischen Aktivität der QC ausreichend kompensieren können.

Bereits 1999 postulierten Sykes und Kollegen auf Grund von Differenzen zwischen gemessener QC-mRNA-Konzentration, QC-Enzymaktivität und detektierter QC-Immunreaktivität in bovinem Milzgewebe, die Existenz von QC-Isoenzymen (Sykes *et al.*, 1999). Später wurden diese Vermutungen von anderen Gruppen durch die Identifikation von QC-Isoenzymen bestätigt (Cynis, 2009; Cynis *et al.*, 2011). Interessanterweise zeigen QC und eine weitere als isoQC bezeichnete Isoform nur eine geringe Aminosäuresequenzhomologie, aus der unterschiedliche zelluläre

Lokalisationen und Funktionen geschlossen wurden. Folglich ist es nicht zu erwarten, dass der Effekt von spezifischen QC-Inhibitoren durch QC-Isoenzyme kompensiert wird (Cynis, 2009).

Überzeugenderweise sind homozygote QC Knock-out Mäuse bei nur gering erniedrigten Hormonspiegeln und einer milden Hypothyreose phänotypisch unauffällig und zeigen keine motorischen oder kognitiven Defizite, sodass vor dem Hintergrund der gewebespezifischen Expression von QC und QC-Isoenzymen eine gute Verträglichkeit für Inhibitoren der humanen QC vorausgesagt wird (Schilling *et al.*, 2011).

Neben der Reduktion von pE-Abeta könnten QC-Inhibitoren auch eine antiinflammatorische Wirkung entfalten und zur Reduktion vaskulärer Ereignisse beitragen, wie es hinsichtlich der Bildung von Chemokinen diskutiert wurde (Orgogozo *et al.*, 2003; Cynis, 2009, Cynis *et al.*, 2011). Wohingegen auch die passive Vakzination gegen pE-Abeta die Gefahr der Neuroinflammation birgt, wie erste Immunisierungstudien gegen Abeta(1-42) zeigen, die auf Grund des gehäuftten Auftretens von Meningoenzephalitiden abgebrochen werden mussten (Orgogozo *et al.*, 2003). Die Ergebnisse einer jüngeren randomisierten, Plazebo-kontrollierten Studie zeigen zudem, dass die Beseitigung von Abeta allein nicht zu Verbesserungen für das Langzeitüberleben oder der kognitiven Leistungsfähigkeit von Alzheimerpatienten führt (Holmes *et al.*, 2008). Es muss folglich davon ausgegangen werden, dass diese Therapieansätze wie auch QC-Inhibitoren nur bedingt zur Wiederherstellung kognitiver Defizite geeignet sind, nachdem eine neuronale Schädigung bereits eingetreten ist (Galimberti und Scarpini, 2011).

Um die Wirkungen von QC-Inhibitoren abzuwägen und der Entwicklung geeigneter Wirkstoffe frische Impulse zu liefern, können Untersuchungen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wertvolle Beiträge leisten und sollten mit dem Ziel der Kartierung der QC-Expression im humanen Gehirn intensiviert werden.

## 5. Zusammenfassung

Intra- und extrazelluläre  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen (Abeta) sind ein neuropathologisches Hauptmerkmal der Alzheimerschen Demenz (AD).

Aktuelle Studien belegen, dass nicht Abeta-Plaques, sondern Abeta-Oligomere die Schädigung von Synapsen und Nervenzellen verursachen und dass ihre Konzentration gut mit der Schwere der kognitiven Dysfunktion korreliert. Allerdings sind Abeta-Peptide eine heterogene Gruppe schwer wasserlöslicher Peptide mit zahlreichen C- und N-terminalen Modifikationen. Dabei hängt die Tendenz von Abeta-Peptiden Oligomeren zu bilden, ihre proteolytische Resistenz und ihr neurotoxisches Potential maßgeblich von ihrer N-terminalen Struktur ab. Abeta-Peptide, die N-terminal einen Pyroglutamyl-Laktamring (pE-Abeta) aufweisen, machen einen Hauptbestandteil der Abeta-Last in den frühen Stadien der AD aus. Diese modifizierten Abeta-Peptide aggregieren schneller als unmodifiziertes Abeta, sind gegen Proteolyse geschützt und wirken als Aggregationskeim für andere Abeta-Spezies. Das Enzym Glutaminylzyklase (QC) katalysiert die n-terminale pE-Modifikation von Abeta *in vitro* und *in vivo* und wird in Neuronenpopulationen gefunden, für die ein starker Verlust von Synapsen und Neuronen im Zusammenhang mit der AD beschrieben wurde.

Diese Arbeit stellt die schichtspezifische Verteilung von QC im temporalen Kortex und der hippocampalen Formation von Alzheimerpatienten und Kontrollen vergleichend dar und zeigt einen direkten Zusammenhang zwischen der Überexpression von QC und der Vulnerabilität betreffender Neuronenpopulationen auf. Darüber hinaus bestätigen die vorgestellten Ergebnisse die These, wonach QC und pE-Abeta das Potential haben, nach axonalem Transport eine Kaskade in efferenten Hirnregionen zu initiieren, an deren Ende der Verlust von Nervenzellen steht.

Diese Erkenntnisse unterstützen das Interesse an QC als Gegenstand zukünftiger Grundlagenforschung und Wirkstoffentwicklungen für die Therapie der AD.

## Abstract

Intra- and extracellular  $\beta$ -amyloid (Abeta) deposits are a major neuropathological hallmark of Alzheimer's disease (AD).

Recent studies demonstrate that Abeta oligomers rather than Abeta plaques cause severe damage of synapses and nerve cells and in addition the concentration of Abeta oligomers correlates well with the severity of cognitive dysfunction. However, Abeta peptides are a heterogeneous group of poorly water-soluble peptides with various C- and N-terminal modifications. Biophysical properties of these peptides such as their propensity to form oligomers, their proteolytic resistance and their neurotoxic potential particularly depends on their N-terminal structure. Abeta-peptides that contain a pyroglutamyl- $\alpha$ -lactam ring at their N-Terminus (pE-Abeta) constitute a major component of the Abeta load in the early stages of AD. These modified Abeta-peptides aggregate faster than unmodified Abeta, are protected against proteolysis and act as aggregation seed for other Abeta-species. The enzyme glutaminyl cyclase (QC) catalyzes the cyclization of Abeta to pE-Abeta *in vitro* and *in vivo* and is found in neuronal populations for which a strong loss of synapses and neurons in the context of AD is described.

This thesis presents the layer-specific distribution of QC in the temporal cortex and the hippocampal formation of Alzheimer's patients and controls, showing a direct correlation between the overexpression of QC and the vulnerability of respective neuronal populations. Moreover, the presented results confirm the hypothesis that QC and pE-Abeta have the potential to initiate a cascade leading to the loss of nerve cells due to axonal transport and release in efferent brain regions. These findings support the interest in QC as a subject of fundamental research and future drug developments for the treatment of AD.

## 6. Literaturverzeichnis

- Allinson** TMJ; Parkin, Edward T.; Turner, Anthony J.; Hooper, Nigel M. (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J. Neurosci. Res* 74:342–352.
- Andersen** P (2007) *The hippocampus book*. Oxford; New York: Oxford University Press.
- Arendt** T (2009) Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118:167–179.
- Arendt** T; Bigl, V.; Arendt, A.; Tennstedt, A. (1983) Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease, paralysis agitans and Korsakoff's Disease. *Acta Neuropathol* 61:101–108.
- Blennow** K; Leon, Mony J. de; Zetterberg, Henrik (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* 368:387–403.
- Böckers** TM; Kreutz, M. R.; Pohl, T. (1995) Glutaminyl-cyclase expression in the bovine/porcine hypothalamus and pituitary. *J. Neuroendocrinol* 7:445–453.
- Bondareff** W; Mountjoy, C. Q.; Roth, M.; Rossor, M. N.; Iversen, L. L.; Reynolds, G. P.; Hauser, D. L. (1987) Neuronal degeneration in locus ceruleus and cortical correlates of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1:256–262.
- Braak** H; Braak, E. (1991) Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239–259.
- Braak** H; Braak, E. (1992) The human entorhinal cortex: normal morphology and lamina-specific pathology in various diseases. *Neurosci. Res* 15:6–31.
- Braak** E; Griffling, K.; Arai, K.; Bohl, J.; Bratzke, H.; Braak, H. (1999) Neuropathology of Alzheimer's disease: what is new since A. Alzheimer? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249 Suppl 3:14–22.
- Busby** WH; Quackenbush, G. E.; Humm, J.; Youngblood, W. W.; Kizer, J. S. (1987) An enzyme(s) that converts glutaminyl-peptides into pyroglutamyl-peptides. Presence in pituitary, brain, adrenal medulla, and lymphocytes. *J. Biol. Chem* 262:8532–8536.
- Busch** C; Bohl, J.; Ohm, T. G. (1997) Spatial, temporal and numeric analysis of Alzheimer changes in the nucleus coeruleus. *Neurobiol. Aging* 18:401–406.
- Castellani** RJ; Rolston, Raj K.; Smith, Mark A. (2010) Alzheimer disease. *Dis Mon* 56:484–546.
- Coyle** JT; Price, D. L.; DeLong, M. R. (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219:1184–1190.
- Crain** BJ; Burger, P. C. (1988) The laminar distribution of neuritic plaques in the fascia dentata of patients with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 76:87–93.
- Cynis** H (2009) Untersuchungen zur Rolle der Glutaminyl-Cyclase bei der pathologischen Bildung von Pyroglutamyl-Peptiden. Halle.

- Cynis H et al. (2011)** The isoenzyme of glutaminy cyclase is an important regulator of monocyte infiltration under inflammatory conditions. *EMBO Mol Med* 3:545–558.
- Cynis H; Scheel, Eike; Saido, Takaomi C.; Schilling, Stephan; Demuth, Hans-Ulrich (2008)** Amyloidogenic processing of amyloid precursor protein: evidence of a pivotal role of glutaminy cyclase in generation of pyroglutamate-modified amyloid-beta. *Biochemistry* 47:7405–7413.
- Cynis H; Schilling, Stephan; Bodnár, Mandy; Hoffmann, Torsten; Heiser, Ulrich; Saido, Takaomi C.; Demuth, Hans-Ulrich (2006)** Inhibition of glutaminy cyclase alters pyroglutamate formation in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1764:1618–1625.
- Dahl SW; Slaughter, C.; Lauritzen, C.; Bateman, R. C.; Connerton, I.; Pedersen, J. (2000)** Carica papaya glutamine cyclotransferase belongs to a novel plant enzyme subfamily: cloning and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expr. Purif* 20:27–36.
- D'Arrigo C; Tabaton, Massimo; Perico, Angelo (2009)** N-terminal truncated pyroglutamyl beta amyloid peptide Aβ<sub>3-42</sub> shows a faster aggregation kinetics than the full-length Aβ<sub>1-42</sub>. *Biopolymers* 91:861–873.
- Delrieu J; Ousset, P. J.; Caillaud, C.; Vellas, B. (2011)** "Clinical trials in Alzheimer's disease": immunotherapy approaches. *Journal of neurochemistry*.
- Duce JA; Bush, Ashley I. (2010)** Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. *Prog. Neurobiol* 92:1–18.
- Duvernoy HM (2005)** The Human Hippocampus. Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI. s.l: Springer-Verlag.
- Dyrks T; Weidemann, A.; Multhaup, G.; Salbaum, J. M.; Lemaire, H. G.; Kang, J.; Müller-Hill, B.; Masters, C. L.; Beyreuther, K. (1988)** Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J* 7:949–957.
- Eisenmenger M; Pötzsch, Olga; Sommer, Bettina (2006)** Bevölkerung Deutschlands bis 2050. 11. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung.
- Fischer WH; Spiess, J. (1987)** Identification of a mammalian glutaminy cyclase converting glutaminy into pyroglutamyl peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 84:3628–3632.
- Galimberti D; Scarpini, Elio (2011)** Disease-modifying treatments for Alzheimer's disease. *Ther Adv Neurol Disord* 4:203–216.
- Gandy S (2005)** The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest* 115:1121–1129.
- German DC; Manaye, K. F.; White, C. L.; Woodward, D. J.; McIntire, D. D.; Smith, W. K.; Kalaria, R. N.; Mann, D. M. (1992)** Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Ann. Neurol* 32:667–676.



- Goedert M**; Klug, Aaron; Crowther, R. Anthony (2006) Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis* 9:195–207.
- Golde TE**; Estus, S.; Usiak, M.; Younkin, L. H.; Younkin, S. G. (1990) Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron* 4:253–267.
- Gómez-Isla T**; Price, J. L.; McKeel, DWJr; Morris, J. C.; Growdon, J. H.; Hyman, B. T. (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16:4491–4500.
- Gunn A**; Masters, ColinL; Cherny, RobertA (2010) Pyroglutamate-Abeta: Role in the natural history of Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1915–1918.
- Gunten A von**; Kövari, Enikő; Bussi re, Thierry; Rivara, Claire-B n dicte; Gold, Gabriel; Bouras, Constantin; Hof, Patrick R.; Giannakopoulos, Panteleimon (2006) Cognitive impact of neuronal pathology in the entorhinal cortex and CA1 field in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 27:270–277.
- Haass C** (2004) Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J* 23:483–488.
- Hardy JA**; Higgins, G. A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184–185.
- Hardy J**; Selkoe, Dennis J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356.
- Harigaya Y**; Saido, T. C.; Eckman, C. B.; Prada, C. M.; Shoji, M.; Younkin, S. G. (2000) Amyloid beta protein starting pyroglutamate at position 3 is a major component of the amyloid deposits in the Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun* 276:422–427.
- Haroutunian V**; Katsel, Pavel; Schmeidler, James (2009) Transcriptional vulnerability of brain regions in Alzheimer's disease and dementia. *Neurobiol Aging* 30:561–573.
- Hartlage-Rübsamen M**; Morawski, Markus; Waniek, Alexander; Jäger, Carsten; Zeitschel, Ulrike; Koch, Birgit; Cynis, Holger; Schilling, Stephan; Schliebs, Reinhard; Demuth, Hans-Ulrich; Rossner, Steffen (2011) Glutaminyl cyclase contributes to the formation of focal and diffuse pyroglutamate (pGlu)-A  deposits in hippocampus via distinct cellular mechanisms. *Acta Neuropathol* 121:705–719.
- Hartlage-Rübsamen M**; Staffa, Katharina; Waniek, Alexander; Wermann, Michael; Hoffmann, Torsten; Cynis, Holger; Schilling, Stephan; Demuth, Hans-Ulrich; Rossner, Steffen (2009) Developmental expression and subcellular localization of glutaminyl cyclase in mouse brain. *Int. J. Dev. Neurosci* 27:825–835.
- He W**; Barrow, C. J. (1999) The A beta 3-pyroglutamyl and 11-pyroglutamyl peptides found in senile plaque have greater beta-sheet forming and aggregation propensities in vitro than full-length A beta. *Biochemistry* 38:10871–10877.

- Heneka MT**; Ramanathan, Mutiah; Jacobs, Andreas H.; Dumitrescu-Ozimek, Lucia; Bilkei-Gorzo, Andras; Debeir, Thomas; Sastre, Magdalena; Galldiks, Norbert; Zimmer, Andreas; Hoehn, Mathias; Heiss, Wolf-Dieter; Klockgether, Thomas; Staufenbiel, Matthias (2006) Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J. Neurosci* 26:1343–1354.
- Hof PR**; Cox, K.; Morrison, J. H. (1990) Quantitative analysis of a vulnerable subset of pyramidal neurons in Alzheimer's disease: I. Superior frontal and inferior temporal cortex. *J Comp Neurol* 301:44–54.
- Holmes C**; Boche, Delphine; Wilkinson, David; Yadegarfar, Ghasem; Hopkins, Vivienne; Bayer, Anthony; Jones, RoyW; Bullock, Roger; Love, Seth; Neal, JamesW; Zotova, Elina; Nicoll, JamesAR (2008) Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* 372:216–223.
- Holtzman DM** (2004) In vivo effects of ApoE and clusterin on amyloid-beta metabolism and neuropathology. *J. Mol. Neurosci* 23:247–254.
- Hook V**; Schechter, Israel; Demuth, Hans-Ulrich; Hook, Gregory (2008) Alternative pathways for production of beta-amyloid peptides of Alzheimer's disease. *Biol. Chem* 389:993–1006.
- Horesh Y**; Katsel, P.; Haroutunian, V.; Domany, E. (2011) Gene expression signature is shared by patients with Alzheimer's disease and schizophrenia at the superior temporal gyrus. *European Journal of Neurology* 18:410–424.
- Iwatsubo T**; Odaka, A.; Suzuki, N.; Mizusawa, H.; Nukina, N.; Ihara, Y. (1994) Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13:45–53.
- Jackisch R**; Gansser, Simon; Cassel, Jean-Christophe (2008) Noradrenergic denervation facilitates the release of acetylcholine and serotonin in the hippocampus: towards a mechanism underlying upregulations described in MCI patients? *Exp. Neurol* 213:345–353.
- Jawhar S**; Trawicka, Anna; Jenneckens, Carolin; Bayer, ThomasA; Wirths, Oliver (2012) Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal Abeta aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33:196.e29-40.
- Jawhar S**; Wirths, Oliver; Schilling, Stephan; Graubner, Sigrid; Demuth, Hans-Ulrich; Bayer, Thomas A. (2011) Overexpression of glutaminyl cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate A{beta} formation, induces behavioral deficits, and glutaminyl cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5XFAD mice. *J. Biol. Chem* 286:4454–4460.
- Kalinin S**; Gavrilyuk, Vitaliy; Polak, Paul E.; Vasser, Robert; Zhao, Jie; Heneka, Michael T.; Feinstein, Douglas L. (2007) Noradrenaline deficiency in brain increases beta-amyloid plaque burden in an animal model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 28:1206–1214.

- Kang J**; Lemaire, H. G.; Unterbeck, A.; Salbaum, J. M.; Masters, C. L.; Grzeschik, K. H.; Multhaup, G.; Beyreuther, K.; Müller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733–736.
- Kim J**; Onstead, Luisa; Randle, Suzanne; Price, Robert; Smithson, Lisa; Zwizinski, Craig; Dickson, Dennis W.; Golde, Todd; McGowan, Eileen (2007) Abeta40 inhibits amyloid deposition in vivo. *J. Neurosci* 27:627–633.
- Koffie RM**; Meyer-Luehmann, Melanie; Hashimoto, Tadafumi; Adams, Kenneth W.; Mielke, Matthew L.; Garcia-Alloza, Monica; Micheva, Kristina D.; Smith, Stephen J.; Kim, M. Leo; Lee, Virginia M.; Hyman, Bradley T.; Spires-Jones, Tara L. (2009) Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 106:4012–4017.
- Kumar S**; Rezaei-Ghaleh, Nasrollah; Terwel, Dick; Thal, DietmarR; Richard, Melisande; Hoch, Michael; Mc, DonaldJessicaM; Wullner, Ullrich; Glebov, Konstantin; Heneka, MichaelT; Walsh, DominicM; Zweckstetter, Markus; Walter, Jochen (2011) Extracellular phosphorylation of the amyloid beta-peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease. *EMBO J* 30:2255–2265.
- Kummer M**; Hermes, Michael; Delekarte, Andrea; Hammerschmidt, Thea; Kumar, Sathish; Terwel, Dick; Walter, Jochen; Pape, Hans-Christian; König, Simone; Roeber, Sigrun; Jessen, Frank; Klockgether, Thomas; Korte, Martin; Heneka, MichaelT (2011) Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid beta aggregation and plaque formation. *Neuron* 71:833–844.
- Lambert M**; Velasco, PaulineT; Chang, Lei; Viola, KirstenL; Fernandez, Sara; Lacor, PascaleN; Khuon, Daliya; Gong, Yuesong; Bigio, EileenH; Shaw, Pamela; De, FeliceFernandaG; Krafft, GrantA; Klein, WilliamL (2007) Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *J Neurochem* 100:23–35.
- Lazarov O**; Lee, Michael; Peterson, Daniel A.; Sisodia, Sangram S. (2002) Evidence that synaptically released beta-amyloid accumulates as extracellular deposits in the hippocampus of transgenic mice. *J. Neurosci* 22:9785–9793.
- Lei P**; Ayton, Scott; Finkelstein, David I.; Spoerri, Loredana; Ciccotosto, Giuseppe D.; Wright, David K.; Wong, Bruce X. W.; Adlard, Paul A.; Cherny, Robert A.; Lam, Linh Q.; Roberts, Blaine R.; Volitakis, Irene; Egan, Gary F.; McLean, Catriona A.; Cappai, Roberto; Duce, James A.; Bush, Ashley I. (2012) Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat Med* 18:291–295.
- Lichtenthaler SF** (2011) Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J. Neurochem* 116:10–21.
- Lichtenthaler SF**; Haass, Christian; Steiner, Harald (2011) Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. *J. Neurochem* 117:779–796.

- Liu K;** Solano, Ingrid; Mann, David; Lemere, Cynthia; Mercken, Marc; Trojanowski, John Q.; Lee, Virginia M-Y (2006) Characterization of Abeta11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated Abeta species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 112:163–174.
- Low WC;** Roepke, J.; Farber, S. D.; Hill, T. G.; Sattin, A.; Kubek, M. J. (1989) Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the hippocampal formation as determined by radioimmunoassay. *Neurosci Lett* 103:314–319.
- Luo L;** Yano, Naohiro; Mao, QuanFu; Jackson, I. M. D.; Stopa, E. G. (2002) Thyrotropin releasing hormone (TRH) in the hippocampus of Alzheimer patients. *J. Alzheimers Dis.* 4:97–103.
- Mai JK;** Assheuer, Joseph; Paxinos, George (2004) Atlas of the human brain. Amsterdam ; London: Elsevier Academic.
- Marcello A;** Wirths, Oliver; Schneider-Axmann, Thomas; Degerman-Gunnarsson, Malin; Lannfelt, Lars; Bayer, Thomas A. (2011) Reduced levels of IgM autoantibodies against N-truncated pyroglutamate A $\beta$  in plasma of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 32:1379–1387.
- McColl G;** Roberts, Blaine R.; Gunn, Adam P.; Perez, Keyla A.; Tew, Deborah J.; Masters, Colin L.; Barnham, Kevin J.; Cherny, Robert A.; Bush, Ashley I. (2009) The *Caenorhabditis elegans* A beta 1-42 model of Alzheimer disease predominantly expresses A beta 3-42. *J. Biol. Chem* 284:22697–22702.
- McGowan E;** Pickford, Fiona; Kim, Jungsu; Onstead, Luisa; Eriksen, Jason; Yu, Cindy; Skipper, Lisa; Murphy, M. Paul; Beard, Jenny; Das, Pritam; Jansen, Karen; Delucia, Michael; Lin, Wen-Lang; Dolios, Georgia; Wang, Rong; Eckman, Christopher B.; Dickson, Dennis W.; Hutton, Mike; Hardy, John; Golde, Todd (2005) Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron* 47:191–199.
- McLean CA;** Cherny, R. A.; Fraser, F. W.; Fuller, S. J.; Smith, M. J.; Beyreuther, K.; Bush, A. I.; Masters, C. L. (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol* 46:860–866.
- Messer M;** Ottesen, M. (1965) Isolation and properties of glutamine cyclotransferase of dried papaya latex. *C R Trav Lab Carlsberg* 35:1–24.
- Miravalle L;** Calero, Miguel; Takao, Masaki; Roher, Alex E.; Ghetti, Bernardino; Vidal, Ruben (2005) Amino-terminally truncated Abeta peptide species are the main component of cotton wool plaques. *Biochemistry* 44:10810–10821.
- Morawski M;** Hartlage-Rübsamen, Maïke; Jäger, Carsten; Waniek, Alexander; Schilling, Stephan; Schwab, Claudia; McGeer, Patrick L.; Arendt, Thomas; Demuth, Hans-Ulrich; Rossner, Steffen (2010) Distinct glutaminyl cyclase expression in Edinger-Westphal nucleus, locus coeruleus and nucleus basalis Meynert contributes to pGlu-Abeta pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 120:195–207.

- Munson** GW; Roher, A. E.; Kuo, Y. M.; Gilligan, S. M.; Reardon, C. A.; Getz, G. S.; LaDu, M. J. (2000) SDS-stable complex formation between native apolipoprotein E3 and beta-amyloid peptides. *Biochemistry* 39:16119–16124.
- Muresan** Z; Muresan, Virgil (2008) Seeding neuritic plaques from the distance: a possible role for brainstem neurons in the development of Alzheimer's disease pathology. *Neurodegener Dis* 5:250–253.
- Näslund** J; Haroutunian, V.; Mohs, R.; Davis, K. L.; Davies, P.; Greengard, P.; Buxbaum, J. D. (2000) Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* 283:1571–1577.
- Orgogozo** J; Gilman, S.; Dartigues, J-F; Laurent, B.; Puel, M.; Kirby, L. C.; Jouanny, P.; Dubois, B.; Eisner, L.; Flitman, S.; Michel, B. F.; Boada, M.; Frank, A.; Hock, C. (2003) Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61:46–54.
- Esiri** M (2001) Pathological correlates of late-onset dementia in a multicentre, community-based population in England and Wales. Neuropathology Group of the Medical Research Council Cognitive Function and Ageing Study (MRC CFAS). *Lancet* 357:169–175.
- Piccini** A; Russo, Claudio; Gliozzi, Alessandra; Relini, Annalisa; Vitali, Antonella; Borghi, Roberta; Giliberto, Luca; Armirotti, Andrea; D'Arrigo, Cristina; Bachi, Angela; Cattaneo, Angela; Canale, Claudio; Torrassa, Silvia; Saido, Takaomi C.; Markesbery, William; Gambetti, Pierluigi; Tabaton, Massimo (2005) beta-amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem* 280:34186–34192.
- Pike** CJ; Overman, M. J.; Cotman, C. W. (1995) Amino-terminal deletions enhance aggregation of beta-amyloid peptides in vitro. *J. Biol. Chem* 270:23895–23898.
- Pohl** T; Zimmer, M.; Mugele, K.; Spiess, J. (1991) Primary structure and functional expression of a glutaminyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88:10059–10063.
- Portelius** E; Bogdanovic, Nenad; Gustavsson, Mikael K.; Volkman, Inga; Brinkmalm, Gunnar; Zetterberg, Henrik; Winblad, Bengt; Blennow, Kaj (2010) Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 120:185–193.
- Roberson** ED; Mucke, Lennart (2006) 100 years and counting: prospects for defeating Alzheimer's disease. *Science* 314:781–784.
- Rossner** S; Sastre, Magdalena; Bourne, Krystyn; Lichtenthaler, Stefan F. (2006) Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression--implications for Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol* 79:95–111.
- Rossner** S; Ueberham, U.; Schliebs, R.; Perez-Polo, J. R.; Bigl, V. (1998) The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Prog. Neurobiol* 56:541–569.
- Russo** C; Schettini, G.; Saido, T. C.; Hulette, C.; Lippa, C.; Lannfelt, L.; Ghetti, B.; Gambetti, P.; Tabaton, M.; Teller, J. K. (2000) Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. *Nature* 405:531–532.

- Russo C**; Violani, Elisabetta; Salis, Serena; Venezia, Valentina; Dolcini, Virginia; Damonte, Gianluca; Benatti, Umberto; D'Arrigo, Cristina; Patrone, Eligio; Carlo, Pia; Schettini, Gennaro (2002) Pyroglutamate-modified amyloid beta-peptides--A $\beta$ N3(pE)--strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J. Neurochem* 82:1480–1489.
- Sütterlin S**; Hoßmann, Iris; Klingholz, Reiner (2011) Demenz Report. Wie sich die Regionen in Deutschland, Österreich und der Schweiz auf die Alterung der Gesellschaft vorbereiten können.
- Saido TC** (1998) Alzheimer's disease as proteolytic disorders: anabolism and catabolism of beta-amyloid. *Neurobiol. Aging* 1998:S69-75.
- Saido TC**; Iwatsubo, T.; Mann, D. M.; Shimada, H.; Ihara, Y.; Kawashima, S. (1995) Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A $\beta$  N3(pE), in senile plaques. *Neuron* 14:457–466.
- Saido TC**; Yamao-Harigaya, W.; Iwatsubo, T.; Kawashima, S. (1996) Amino- and carboxyl-terminal heterogeneity of beta-amyloid peptides deposited in human brain. *Neurosci. Lett* 215:173–176.
- Scheff SW**; Price, Douglas A. (1993) Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 33:190–199.
- Schilling S** (2004) Charakterisierung der humanen Glutaminyl-Cyclase im Vergleich mit dem analogen Enzym aus *Carica papaya*. Halle, Saale, Halle: Universitäts- und Landesbibliothek.
- Schilling S**; Appl, Thomas; Hoffmann, Torsten; Cynis, Holger; Schulz, Katrin; Jagla, Wolfgang; Friedrich, Daniel; Wermann, Michael; Buchholz, Mirko; Heiser, Ulrich; Hörsten, Stephan von; Demuth, Hans-Ulrich (2008b) Inhibition of glutaminyl cyclase prevents pGlu-A $\beta$  formation after intracortical/hippocampal microinjection in vivo/in situ. *J. Neurochem* 106:1225–1236.
- Schilling S**; Hoffmann, Torsten; Manhart, Susanne; Hoffmann, Matthias; Demuth, Hans-Ulrich (2004) Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett* 563:191–196.
- Schilling S**; Kohlmann, Stephanie; Bäuscher, Christoph; Sedlmeier, Reinhard; Koch, Birgit; Eichentopf, Rico; Becker, Andreas; Cynis, Holger; Hoffmann, Torsten; Berg, Sabine; Freyse, Ernst-Joachim; Hörsten, Stephan von; Rossner, Steffen; Graubner, Sigrid; Demuth, Hans-Ulrich (2011) Glutaminyl cyclase knock-out mice exhibit slight hypothyroidism but no hypogonadism: implications for enzyme function and drug development. *J. Biol. Chem* 286:14199–14208.
- Schilling S**; Lauber, Thomas; Schaupp, Michael; Manhart, Susanne; Scheel, Eike; Böhm, Gerald; Demuth, Hans-Ulrich (2006) On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro). *Biochemistry* 45:12393–12399.



- Schilling S**; Zeitschel, Ulrike; Hoffmann, Torsten; Heiser, Ulrich; Francke, Mike; Kehlen, Astrid; Holzer, Max; Hutter-Paier, Birgit; Prokesch, Manuela; Windisch, Manfred; Jagla, Wolfgang; Schlenzig, Dagmar; Lindner, Christiane; Rudolph, Thomas; Reuter, Gunter; Cynis, Holger; Montag, Dirk; Demuth, Hans-Ulrich; Rossner, Steffen (2008a) Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat. Med* 14:1106–1111.
- Schlenzig D**; Manhart, Susanne; Cinar, Yeliz; Kleinschmidt, Martin; Hause, Gerd; Willbold, Dieter; Funke, Susanne Aileen; Schilling, Stephan; Demuth, Hans-Ulrich (2009) Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides. *Biochemistry* 48:7072–7078.
- Selkoe DJ (1996)** Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem* 271:18295–18298.
- Selkoe DJ (2001)** Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81:741–766.
- Sergeant N**; Bombois, Stepanie; Ghestem, Antoine; Drobecq, Hervé; Kostanjevecki, Vesna; Missiaen, Carla; Wattez, Annick; David, Jean-Phillipe; Vanmechelen, Eugene; Sergheraert, Christian; Delacourte, André (2003) Truncated beta-amyloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *J. Neurochem* 85:1581–1591.
- Simic G**; Kostovic, I.; Winblad, B.; Bogdanovic, N. (1997) Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* 379:482–494.
- Steel K (1997)** The elderly: the single greatest achievement of mankind. *Disabil Rehabil* 19:130–133.
- Stranahan AM**; Mattson, Mark P. (2010) Selective Vulnerability of Neurons in Layer II of the Entorhinal Cortex during Aging and Alzheimer's Disease. *Neural Plasticity* 2010:1–8.
- Streit W (2004)** Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci Res* 77:1–8.
- Sykes PA**; Watson, S. J.; Temple, J. S.; Bateman, R. C. (1999) Evidence for tissue-specific forms of glutaminyl cyclase. *FEBS Lett* 455:159–161.
- Takahashi RH**; Almeida, Claudia G.; Kearney, Patrick F.; Yu, Fangmin; Lin, Michael T.; Milner, Teresa A.; Gouras, Gunnar K. (2004) Oligomerization of Alzheimer's beta-amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain. *J. Neurosci* 24:3592–3599.
- Tezapsidis N**; Li, H. C.; Ripellino, J. A.; Efthimiopoulos, S.; Vassilacopoulou, D.; Sambamurti, K.; Toneff, T.; Yasothornsrikul, S.; Hook, V. Y.; Robakis, N. K. (1998) Release of nontransmembrane full-length Alzheimer's amyloid precursor protein from the lumenar surface of chromaffin granule membranes. *Biochemistry* 37:1274–1282.
- Turner RS (2006)** Alzheimer's disease. *Semin Neurol* 26:499–506.

- van Groen T**; LIU, L.; IKONEN, S.; KADISH, I. (2003) Diffuse amyloid deposition, but not plaque number, is reduced in amyloid precursor protein/presenilin 1 double-transgenic mice by pathway lesions. *Neuroscience* 119:1185–1197.
- Vanderstichele H**; Meyer, Geert de; Andreasen, Niels; Kostanjevecki, Vesna; Wallin, Anders; Olsson, Annika; Blennow, Kaj; Vanmechelen, Eugene (2005) Amino-truncated beta-amyloid<sub>42</sub> peptides in cerebrospinal fluid and prediction of progression of mild cognitive impairment. *Clin. Chem* 51:1650–1660.
- Walsh DM**; Selkoe, Dennis J. (2007) A beta oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem* 101:1172–1184.
- Weinshenker D** (2008) Functional consequences of locus coeruleus degeneration in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 5:342–345.
- West MJ**; Coleman, P. D.; Flood, D. G.; Troncoso, J. C. (1994) Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344:769–772.
- Whitehouse PJ**; Price, D. L.; Clark, A. W.; Coyle, J. T.; DeLong, M. R. (1981) Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol* 10:122–126.
- Wirths O**; Bethge, Tobias; Marcello, Andrea; Harmeyer, Anja; Jawhar, Sadim; Lucassen, Paul J.; Multhaup, Gerd; Brody, David L.; Esparza, Thomas; Ingelsson, Martin; Kalimo, Hannu; Lannfelt, Lars; Bayer, Thomas A. (2010b) Pyroglutamate Aβ pathology in APP/PS1KI mice, sporadic and familial Alzheimer's disease cases. *J Neural Transm* 117:85–96.
- Wirths O**; Breyhan, Henning; Cynis, Holger; Schilling, Stephan; Demuth, Hans-Ulrich; Bayer, Thomas A. (2009) Intraneuronal pyroglutamate-Aβ<sub>3-42</sub> triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathol* 118:487–496.
- Wirths O**; Erck, Christian; Martens, Henrik; Harmeyer, Anja; Geumann, Constanze; Jawhar, Sadim; Kumar, Sathish; Multhaup, Gerd; Walter, Jochen; Ingelsson, Martin; Degerman-Gunnarsson, Malin; Kalimo, Hannu; Huitinga, Inge; Lannfelt, Lars; Bayer, Thomas A. (2010a) Identification of low molecular weight pyroglutamate Aβ oligomers in Alzheimer disease: a novel tool for therapy and diagnosis. *J. Biol. Chem.* 285:41517–41524.
- Wirths O**, Multhaup G, Bayer T (2004) A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. *J Neurochem* 91:513–520.
- Yang L**; Lindholm, Kristina; Yan, Riqiang; Citron, Martin; Xia, Weiming; Yang, Xiao-Li; Beach, Thomas; Sue, Lucia; Wong, Philip; Price, Donald; Li, Rena; Shen, Yong (2003) Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat. Med* 9:3–4.
- Yasojima K**; Akiyama, H.; McGeer, E. G.; McGeer, P. L. (2001) Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. *Neurosci. Lett* 297:97–100.

## 7. Anhang

### 7.1. Färbeprotokoll für Immunhistochemie

1. Schnitte 3x in **PBS-T** (0,05% Tween) waschen 10 min.
2. **2% Wasserstoffperoxid**, verdünnt in **60% Methanol** 60 min.  
(Beseitigung endogener Peroxidase-Aktivität)
3. Schnitte 3x in **PBS-T** waschen 10 min.
4. Inkubation in **Blocker A** (unverdünnt) 60 min.  
(Blockung unspezifischer Bindungen)  
(2% BSA + 0,5% Eselserum + 0,3% Casein gelöst in PBS-T)
5. Inkubation mit **primärem Antikörper**, verdünnt in Blocker A 2 d, 4°C
6. Schnitte 3x in **PBS-T** waschen 10 min.
7. Inkubation mit **sekundärem biotinyliertem Antikörper**, 60 min.  
verdünnt in 2 Teile PBS-T und 1 Teil Blocker A,  
immer 1:1000
8. Schnitte 3x in **PBS-T** waschen 10 min.
9. Inkubation in **Extravidin**, verdünnt 1:2000 in PBS-T 60 min.
10. Schnitte 3x in **PBS-T** waschen 10 min.
11. Schnitte 1x in **Tris-HCL**, pH=8,0 waschen 10 min.
12. Inkubation in **DAB-Nickel** ca. 5 min.  
(5 ml Tris-HCL + 20 mg Nickelammoniumsulfat + 2 mg DAB + 2,5 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)  
→ erst Tris+Nickel lösen, kurz vor Entwicklung DAB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dazugeben
13. Schnitte 2x in **Tris-HCL**, pH=8,0 waschen 10 min.
14. Schnitte 2x in **PBS-T** waschen 10 min.
15. Schnitte 2x in **PBS** waschen 10 min.
16. Schnitte aus **PBS (+ 96% Alkohol)** aufziehen und trocknen (40°C)
17. Schnitte in **Aqua dest.** spülen, **aufsteigende Alkoholreihe** (je 2 min)  
und eindecken

## **7.2. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck der Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Moritz Kreuzberger

## 7.3. Lebenslauf

### ANGABEN ZUR PERSON

Name	KREUZBERGER, Moritz
Adresse	Augustenstraße 15, 04317 Leipzig
Institut	Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung
WWW	www.uni-leipzig.de/~pfi
Telefon	+49-(0)341-9725736
E-Mail	MorizKreuzberg@Arcor.de

Staatsangehörigkeit Deutsch

Familienstand Ledig, keine Kinder

Geburtsdatum 30. April 1987

Geburtsort OFFENBACH AM MAIN

SPRACHEN DEUTSCH (MUTTERSPRACHE), ENGLISCH (GUT IN WORT UND SCHRIFT), SPANISCH (GRUNDKENNTNISSE)

### SCHULBILDUNG

- 08/1993 – 08/1998 Grundschole Pestalozzischule Gießen
- 08/1998 – 08/2003 Gymnasium Landschulheim Steinmühle Marburg
- 08/2003 – 08/2006 Gymnasium Martin-Luther-Schule Marburg
- 08/2006 Abschluss der gymnasialen Oberstufe  
mit Allgemeiner Hochschulreife (Abitur)

### ZIVILDIENTST

- 09/2006 – 05/2007 Rettungsdienst (Bayrisches Rotes Kreuz) im Kreis Aschaffenburg mit Ausbildung zum Rettungsdiensthelfer

### STUDIUM UND AUSBILDUNG

- 07/2007 Rettungssanitäterlehrgang und erfolgreiche Prüfung
- 10/2007 – Heute Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
- 11/2008 Abschluss des ersten Abschnittes der ärztlichen Ausbildung (Physikum)
- 9/2009 Ausbildung zum Breitenausbilder für Erste-Hilfe
- 10/2010 – 09/2011 Promotion am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung in der Abteilung „Molekulare und zelluläre Mechanismen der Neurodegeneration“

## 7.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während meiner Arbeit hilfreich zur Seite gestanden haben.

Herrn Prof. Dr. Thomas Arendt danke ich für die Möglichkeit dieses interessante Thema am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung bearbeiten zu dürfen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Steffen Roßner und Frau Dr. Maïke Hartlage-Rübsamen für ihre nette und kompetente Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. Markus Morawski, dessen fachliche Hilfe maßgeblich zur erfolgreichen Bearbeitung meiner Fragestellungen beigetragen hat.

Allen Kollegen des Paul-Flechsig-Instituts danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft während meiner praktischen Arbeit, insbesondere Frau Katja Reimann, Herrn Dr. Carsten Jäger und Frau Hildegard Gruschka für die Unterstützung bei methodischen Fragen und die ausgezeichnete Zusammenarbeit im Labor.

Außerdem danke ich von ganzem Herzen meiner Mutter Frau Dr. Christine Kreuzberger, meinen Großeltern Anneliese und Herbert Kreuzberger sowie meiner Tante und meinem Onkel Birgit und Richard Antonijs für die Förderung und Unterstützung, die sie mir stets gewährt haben um meine Ziele zu verwirklichen.

Ich danke meiner Freundin Maren für ihre Hilfe und Unterstützung in persönlichen wie fachlichen Belangen in all der Zeit.

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit immer wieder Korrektur gelesen haben und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.